
Die Sortierung von Membranproteinen:

Der Einfluss der *codon usage* auf die Sortierung von Modell-Kaliumkanälen

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades

eines *Doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von

Marina Kithil, M.Sc.

aus München

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Adam Bertl

Darmstadt 2018

Kithil, Marina: Die Sortierung von Membranproteinen:

Der Einfluss der *codon usage* auf die Sortierung von Modell-Kaliumkanälen

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUPrints: 2019

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-83508

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2018

Veröffentlicht unter CC BY-NC-ND 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>

Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less.
- Marie Curie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Abstract	iii
1.....Einleitung	1
1.1. Intrazelluläre Proteinsortierung bei Eukaryoten	1
1.1.1. Cotranslationale Proteinsortierung – Proteintransport in das ER	2
1.1.2. Posttranslationale Proteinsortierung – Proteintransport in die Mitochondrien	4
1.1.3. Duales <i>targeting</i> von kerncodierten Proteinen	6
1.1.4. Alternative Proteinsortierungswege	9
1.2. Signalsequenzen	11
1.3. <i>Codon usage</i>	12
1.4. Virale Ionenkanäle als Modellsysteme	13
1.4.1. Die viralen Kaliumkanäle K _{esv} und K _{CV_{PBCV-1}}	14
1.5. Zielsetzung	17
2.....Material und Methoden	19
2.1. Medien und Lösungen	19
2.1.1. Medien	19
2.1.2. Lösungen	20
2.2. Chemikalien	21
2.3. Zelllinien	22
2.4. Codonveränderte DNA-Varianten der Konstrukte	23
2.5. Mutagenese	23
2.6. Heterologe Expression	25
2.7. Fluoreszenz Mikroskopie – CLSM	25
2.8. Durchflusszytometrie	27
2.8.1. Mitochondriales Membranpotential	27
2.8.2. Zellzyklusanalyse	27
2.9. Westernblot	28
2.10. Statistische Analyse	29
3.....Ergebnisse und Diskussion	30
3.1. K _{esv}	30
3.1.1. Vorangegangene Studien	30

3.1.2. Statistische Analyse der prozentualen Lokalisation von Kesv::eGFP	30
3.2. Die Translationseffizienz hat keinen Einfluss auf die Sortierung von Kesv	36
3.2.1. Kesv _{opt}	36
3.2.2. Kesv _{deopt}	53
3.2.3. Kesv _{random}	58
3.3. Kesv-Kesv _{opt} -Chimären	63
3.3.1. Einführung zur Struktur der Chimären Kesv ₁ bis Kesv ₆	63
3.3.2. Einführung und erweiterte Analyse der Kategorie „Mito+ER“	66
3.3.3. Untersuchung der Sortierungsverteilung der Chimären Kesv ₁ bis Kesv ₆	69
3.3.4. Untersuchung der Sortierungsverteilung der 30/50-Kesv-Kesv _{opt} -Chimären	91
3.4. Kcv _{PBCV-1}	99
3.4.1. Vorangegangene Studien und Vergleich mit Kesv	99
3.4.2. Statistische Analyse der prozentualen Lokalisation von Kcv::eGFP	100
3.5. Kcv _{opt}	102
3.6. Kcv-Kesv-Chimären	105
3.6.1. Vorangegangene Studien	105
3.6.2. Statistische Analyse der Chim3.3, Chim3.4 und Chim4 und ihrer codonoptimierten Version	106
3.6.3. Chim3.3 _{26/68opt} /Chim3.3 _{opt26/68wt}	112
4.....Fazit und Ausblick	122
5.....Literaturverzeichnis	126
6.....Anhang	135
6.1. DNA- und Aminosäuresequenzen	135
6.2. Oligonukleotide	140
6.3. Abbildungsverzeichnis	143
6.4. Abkürzungsverzeichnis	146
6.5. Eigene Arbeit	149
6.6. Ehrenwörtliche Erklärung	150
6.7. Lebenslauf	151
6.8. Danksagung	152

Zusammenfassung

Manche Membranproteine, zu denen auch einige Ionenkanäle gehören, können einer sogenannten Dualen Sortierung (*dual targeting*) unterliegen. Dieses Phänomen beschreibt einen zellulären Sortierungsprozess, bei dem Isoproteine oder auch ein und das selbe Translations-Produkt in verschiedene Zielmembranen, wie z. B. der Plasmamembran, dem ER und den Mitochondrien inseriert werden können. Vor dem Hintergrund der sehr unterschiedlichen Sortierungsmechanismen von Proteinen zur Plasmamembran (cotranslationales *targeting*) oder in die Mitochondrien (posttranslationales *targeting*) ist der genaue Mechanismus, der dem dualen *targeting* von Membranproteinen zu Grunde liegt, noch nicht vollkommen verstanden. Neuere Untersuchungen, die auf einen Zusammenhang zwischen der Codonzusammensetzung eines Gens und der Geschwindigkeit der Synthese des Genproduktes hinweisen, lassen vermuten, dass auch die Kinetik der Proteinsynthese entscheidend für die Sortierung eines naszierenden Proteins sein könnte.

Hier wird der Einfluss der *codon usage* auf die Sortierung von Membranproteinen untersucht. Unter *codon usage* versteht man das Phänomen, dass die möglichen Varianten des genetischen Codes in einem Organismus unterschiedlich häufig verwendet werden wobei häufig benutzte Codons die Proteinsynthese beschleunigen und Seltene diesen Vorgang verlangsamen. Um den Einfluss der *codon usage* auf die Proteinsortierung zu untersuchen, wurden hier zwei homologe virale Kaliumkanäle als Modellsystem genutzt. Die Kanäle Kev aus dem *Ectocarpus siliculosus* Virus 1 und Kcv_{PBCV-1} aus dem *Paramecium Bursaria* Chlorella Virus 1 sind strukturell im hohen Maße ähnlich, unterliegen jedoch nach heterologer Expression in HEK293-Zellen einer komplett unterschiedlichen Sortierung. So ist Kev vor allem in den Mitochondrien lokalisiert, während Kcv über den sekretorischen Weg an die Plasmamembran sortiert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sortierung von Kev und Kcv als Fusionsproteine mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) nach heterologer Expression in HEK293 Zellen quantitativ mit Hilfe der Konfokalmikroskopie untersucht. Dadurch sollte die Sortierungspräferenz der Kanalproteine als Funktion der Codonzusammensetzung in den entsprechenden Genen untersucht werden. Dabei konnte für Kev festgestellt werden, dass der Kanal zwar in der Mehrzahl der Zellen mitochondrial sortiert vorliegt, in einem geringen Anteil (<10 %) der Zellen jedoch auch im ER anzutreffen ist. Eine gezielte Codonoptimierung von Kev, bei der in einem synthetischen Gen seltene Codone durch häufige ersetzt wurden, führte zu einer effizienten Sortierung in die Mitochondrien; in diesem Fall war der Kanal nicht nur in HEK293 Zellen, sondern unabhängig vom untersuchten Zelltyp (COS-7, HeLa, HaCaT, A549) ausschließlich in den Mitochondrien zu finden. Die entgegengesetzte Manipulation bei der in einem synthetischen Gen vorwiegend seltene Codone genutzt wurden, führt zu einer verminderten Sortierung

in die Mitochondrien, sowie zu einer gleichzeitig zunehmenden Fehlsortierung und einem folgenden Abbau des Kanalproteins. Die Daten zeigen erstmalig, dass ein Protein mit unveränderter Aminosäuresequenz in Abhängigkeit von der Codonstruktur des Gens unterschiedlich in Zellen sortiert wird. Dieser Prozess ist proteinspezifisch, da die gleichen Änderungen in der Codonfrequenz von Kcv keinen Einfluss auf dessen Sortierung haben.

Um die Frage zu beantworten, ob es in dem Kcv Gen Bereiche gibt, die besonders kritisch bezüglich ihrer Codonzusammensetzung für die Sortierung des Proteins sind, wurden Chimären aus dem wt Gen und dem codonoptimierten Gen hergestellt; in synthetischen Genen wurden dazu unterschiedliche Bereiche des wt Gens codonoptimiert. Die Analyse der GFP markierten Genprodukte in HEK293 Zellen zeigt, dass eine partielle Codonoptimierung unterschiedliche Sortierungsphänotypen hervorbringt. Je nach Position des codonoptimierten Genbereiches wurde der Kanal i) ausschließlich in die Mitochondrien sortiert, ii) vermehrt ins ER umgeleitet oder iii) fehlsortiert. In besonderen Fällen wurden auch Zellen beobachtet in denen der Kanal in der gleichen Zelle in beiden Kompartimenten, den Mitochondrien und dem ER, lokalisiert war.

Die Untersuchung der Sortierungsphänotypen in Abhängigkeit von der Position im Gen, an der die Codone optimiert wurden, ergeben keinen klaren Hinweis auf einen kritischen Bereich im Gen, der über die Sortierung des Genproduktes entscheidet. Auf Basis der vorliegenden Ergebnisse kann man lediglich spekulieren, dass eine Abfolge von Bereichen mit häufigen und seltenen Codonen für die Sortierung kritisch ist.

Die erhobenen Daten zeigen erstmalig, dass duales *targeting* eines Membranproteins durch die Codonstruktur des Gens gesteuert werden kann. Es kann spekuliert werden, dass ein solcher Mechanismus, der bei einem Modellprotein auftritt, auch unter physiologischen Bedingungen relevant ist. Die Interpretation dieses Phänomens im Zusammenhang mit einer unterschiedlichen Geschwindigkeit der Proteinsynthese, wird durch die hier gezeigten Experimente unterstützt. Diese legen dar, dass die vermehrte Sortierung des Kcv Kanals in die Mitochondrien nach Codonoptimierung durch niedrige Temperaturen bei der Kultivierung der Zellen wieder aufgehoben werden kann. Diese Daten lassen damit den Schluss zu, dass die Translationsgeschwindigkeit mit über den Sortierungsweg eines Proteins entscheidet. Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass diese Sortierung nicht alleine durch die Codonfrequenz des Gens bestimmt wird, sondern, dass dies nur in Kombination mit einem noch nicht definierten Zustand der einzelnen Zelle geschieht. So findet man in der gleichen Präparation das Genprodukt von einem teilweise codonoptimierten Gen entweder im ER oder in den Mitochondrien. Die Frage, warum eine Zelle das gleiche Genprodukt in die Mitochondrien sortiert, während es in der anderen Zelle in den sekretorischen Weg gelangt, kann hier nicht vollständig

beantwortet werden. Die Daten deuten jedoch darauf hin, dass der Ernährungszustand einer Zelle für diese Sortierungsphänomene nicht verantwortlich ist. Zwar besteht eine tendenzielle Abhängigkeit der Sortierung von Zellzyklusphasen, jedoch scheint die Zellzyklusphase nicht ausschließlich das Sortierungsschicksal des Genprodukts zu bestimmen.

Abstract

Some membrane proteins, including ion channels, are subject to dual targeting. This phenomenon describes a cellular sorting process in which isoproteins or the same translational product can be inserted into different target membranes such as the plasma membrane, the ER and the mitochondria. Against the background of the very different sorting mechanisms of proteins to the plasma membrane (cotranslational targeting) or into the mitochondria (posttranslational targeting), the exact mechanism underlying the dual targeting of membrane proteins is not yet fully understood. Recent investigations, which indicate a correlation between the codon composition of a gene and the speed of synthesis of the gene product, suggest that the kinetics of protein synthesis could also be decisive for the sorting of a nascent protein.

Here, the influence of codon usage on the sorting of membrane proteins is investigated. The term codon usage refers to the phenomenon that possible variants of the genetic code in an organism are used with varying frequency. Frequently used codons accelerate protein synthesis while rare codons slow this process down. In order to investigate the influence of codon usage on protein sorting, two homologous viral potassium channels were used as model systems. The channels K_{esv} from *Ectocarpus siliculosus* Virus 1 and K_{cv}_{PBCV-1} from *Paramecium Bursaria* Chlorella Virus 1 are structurally very similar, but are subject to completely different sorting after heterologous expression in HEK293 cells. K_{esv} is located mainly in the mitochondria, while K_{cv} is sorted via the secretory path to the plasma membrane.

In the present work, the sorting of K_{esv} and K_{cv} as fusion proteins with the green fluorescent protein (GFP) after heterologous expression in HEK293 cells was quantitatively investigated using confocal laser scanning microscopy. The aim was to investigate the sorting preference of the channel proteins as a function of the codon composition in the corresponding genes. For K_{esv}, it was found that although in the majority of cells the channel is present in the mitochondria, in a small proportion (<10 %) of the cells K_{esv} is also found in the ER. A targeted codon optimization of K_{esv}, in which rare codons in a synthetic gene were replaced by frequent ones, led to an efficient sorting into the mitochondria; in this case the channel was not only found in HEK293 cells, but independent of the investigated cell type (COS-7, HeLa, HaCaT, A549) exclusively in the mitochondria. The opposite manipulation, in which predominantly rare codons were used in a synthetic gene, leads to a reduced sorting into the mitochondria, as well as to a simultaneously increasing sorting error and a subsequent degradation of the channel protein. The data show for the first time that a protein with the same amino

acid sequence is sorted differently in cells depending on the codon structure of the gene. This process is protein-specific, since the same changes in the codon frequency of Kcv have no influence on its sorting. To answer the question whether there are areas in the Kcsv gene that are particularly critical with regard to their codon composition for the sorting of the protein, chimeras were produced from the wt gene and the codon-optimized gene; in synthetic genes different areas of the wt gene were codon-optimized for this purpose. The analysis of GFP labelled gene products in HEK293 cells shows that partial codon optimization produces different sorting phenotypes. Depending on the position of the codon-optimized gene region, the channel was i) sorted exclusively into the mitochondria, ii) increasingly redirected into the ER or iii) mis-sorted. In special cases, cells were observed in which the channel was located in the same cell in both compartments, mitochondria and ER.

The investigation of the sorting phenotypes depending on the position in the gene at which the codons were optimized does not provide a clear indication of a critical region in the gene that determines the sorting of the gene product. On the basis of the available results one can only speculate that a sequence of areas with frequent and rare codons is critical for sorting.

The collected data show for the first time that dual targeting of a membrane protein can be controlled by the codon structure of the gene. It can be speculated that such a mechanism, which occurs in a model protein, is also relevant under physiological conditions.

The interpretation of this phenomenon in connection with a different speed of protein synthesis is supported by the experiments shown here. These experiments show that the increased sorting of the Kcsv channel into the mitochondria after codon optimization can be reversed by low temperatures during cell cultivation. These data allow the conclusion to be drawn that the speed of translation also determines the sorting pathway of a protein. However, the results also show that this sorting is not solely determined by the codon frequency of the gene, but that this occurs in combination with a not yet defined state of the individual cell. In the same preparation, the gene product of a partially codon-optimised gene can be found either in the ER or in the mitochondria. The question of why one cell sorts the same gene product into the mitochondria while the other cell sorts it into the secretory pathway cannot be answered completely here. However, the data suggest that the nutritional status of a cell is not responsible for these sorting phenomena. Although there is a tendency for sorting to depend on cell cycle phases, the cell cycle phase does not seem to exclusively determine the sorting fate of the gene product.

1. Einleitung

1.1. Intrazelluläre Proteinsortierung bei Eukaryoten

Ein zentraler Unterschied zwischen der prokaryotischen und eukaryotischen Zelle ist die Bildung intrazellulärer Membransysteme und der sogenannten Kompartimente. Dieser Evolutionsschritt ermöglicht es Eukaryoten, biochemische Reaktionen ohne Einbußen zeitgleich und unabhängig von ihrer Umgebung ablaufen zu lassen. Die Kompartimentierung der Zelle erlaubt somit eine diskrete Aufgaben- und Rollenverteilung der einzelnen Organellen und dadurch eine deutliche metabolische Leistungssteigerung.

Die Unterteilung der Zelle bringt jedoch auch logistische Herausforderungen mit sich; neusynthetisierte Proteine müssen nun gerichtet transportiert werden, um ihr designiertes Zielkompartiment zu erreichen. Dieses sogenannte *targeting* von Zellkompartimenten beruht größtenteils darauf, dass Proteine Signalsequenzen z. B. in Form einer bestimmten Aminosäureabfolge tragen, die der Zellmaschinerie ihren Bestimmungsort vermittelt. Da sich die folgende Arbeit mit der Sortierung von Membranproteinen in das endoplasmatische Retikulum (ER) und die Mitochondrien befasst, wird nachfolgend tiefer auf die Transportmechanismen eingegangen, die spezifisch für diese Kompartimente sind.

Klassischerweise werden die meisten Proteine einer eukaryotischen Zelle über die genomische DNA im Nukleolus kodiert, ihre Synthese findet jedoch im Cytosol statt. Im ersten Schritt wird die genomische DNA in prä-mRNA transkribiert, diese wird noch im Zellkern prozessiert und die entstandene mRNA im nächsten Schritt durch die Kernporen ins Cytosol entlassen. Daraufhin lagert sich ein Ribosom an und die Translation kann beginnen. Die passenden tRNAs werden akquiriert und der entsprechende Aminosäurestrang gebildet. Im Verlauf der Proteinbiosynthese gibt es mehrere Zeitpunkte, an denen bereits über die Sortierung des Proteins entschieden wird. Zum einen können auf Ebene der Transkription z. B. durch unterschiedliche Transkriptionsinitiations-Orte, auf Ebene der prä-mRNA-Prozessierung durch alternatives Spleißen oder erst nach Abschluss der Translation durch Prozesse wie Phosphorylierung, Prenylierung oder N-Glykosylierung des prä-Proteins Isoproteine gebildet werden, die sich der Transportmaschinerie anders präsentieren. Zum anderen ist das Sortierungsschicksal eines Proteins abhängig von der Existenz, Struktur und Lage des bereits angesprochenen *targeting* Signals. Die bekanntesten *targeting* Signale, die für das *targeting* von Mitochondrien, Chloroplasten oder dem ER verantwortlich sind, zeichnen sich alle durch ihre Lage am N-Terminus und ihre α -helikale Struktur aus. Jedoch gibt es auch hier eine gewisse Varianz, auf die näher in **Abschnitt 1.2** eingegangen wird. Grundsätzlich werden diese *targeting* Signale jedoch spezifisch von Rezeptorproteinen erkannt, die wiederum den gezielten Transport des Proteins initiieren (Blobel & Dobberstein, 1975). Ein zusätzlicher Faktor, der über die Zielgenauigkeit des Proteintransports entscheidet, ist der Zeitpunkt in der Proteinbiosynthese, an dem der Rezeptor das *targeting* Signal bindet.

Hier wird zwischen der co- und posttranslationalen Sortierung unterschieden, bei denen die Translokation entweder während oder erst nach Abschluss der Translation beginnt. In den folgenden Abschnitten soll es zunächst um den Ablauf der am besten beschriebenen Sortierungswege der co- und posttranslationalen Sortierung mit ihren klassischen Zielkompartimenten gehen, jedoch auch um deren Ausnahmereischeinungen, die das Bild einer klar definierten „entweder..., oder...“-Sortierung für viele Proteine in Frage stellen.

1.1.1. Cotranslationale Proteinsortierung – Proteintransport in das ER

Das ER gilt als Eintrittspunkt für alle Proteine des sekretorischen und endosomalen Weges. Typischerweise findet dieser Proteintransport, sei es für Transmembranproteine oder wasserlösliche Proteine, cotranslational statt (Alberts *et al.*, 2015). Trägt das Vorläufer-Protein ein Signalpeptid am oder nahe des N-Terminus, werden der Transport und die Integration in die ER-Membran in drei Stadien eingeteilt (Lang *et al.*, 2012):

1. *Targeting*
2. Initiale Insertion in die ER-Membran
3. Vollendung der Membranintegration oder Translokation.

Das Signalpeptid wird bei Verlassen des ribosomalen Tunnels durch das *signal recognition particle* (SRP) erkannt (siehe **Abbildung 1.1.1**). Dieses bindet zum einen an das Signalpeptid und besetzt zum anderen die Bindestelle für Elongationsfaktoren an der Schnittstelle der großen und kleinen Untereinheit des Ribosoms. Die Translation kommt zum Stehen (Halic *et al.*, 2004). Dies gibt SRP genug Zeit, den Ribosom-mRNA-Komplex an den ER-membrangebundenen SRP-Rezeptor (SR) heranzuführen (Walter & Blobel, 1981; Meyer & Dobberstein, 1980). Der SR bindet daraufhin den SRP-Ribosom-Komplex (Rapoport, 1992), wobei das Ribosom hingegen selbst an einen Protein-Translokator bindet. Sobald der Ribosom-mRNA-Komplex an den Protein-Translokator gebunden ist, dissoziiert das SR gebundene SRP unter Aufwendung von GTP und die Translation wird wieder aufgenommen. Durch Hydrolyse des GTP wird das SRP vom SR gelöst und ist somit bereit für einen neuen *targeting*-Zyklus (Rapoport, 1992). Der Ribosom-mRNA-Komplex bleibt an den Translokator gebunden. In Eukaryoten wird dieser aus vier Sec61-Komplexen, die sich wiederum aus je drei Untereinheiten zusammensetzen (Sec61 α , Sec61 β und Sec61 γ), gebildet und assoziiert mit anderen Membrankomplexen wie z. B. Oligosaccharid Transferase (OST) oder dem Signal-Peptidase-Komplex (SPC) (Kalies *et al.*, 1994; Ménétret *et al.*, 2000; Beckmann *et al.*, 2001). Die Gesamtheit aus Translokator und den assoziierten Membrankomplexen wird als Translocon bezeichnet und vermittelt den Eintritt des wachsenden Polypeptids durch die ER-Membran (Alberts *et al.*, 2015). Mit Fortlaufen der Translation kommt es häufig jedoch nicht notwendigerweise zur Abspaltung des Signalpeptids durch

den SPC und den darauffolgenden Abbau durch andere Proteasen. Im Fall eines Membranproteins, das die ER-Membran potenziell mehrfach durchspannt, ermöglicht der Sec61-Komplex eine laterale Öffnung, so dass hydrophobe Domänen des Polypeptids in den hydrophoben Kern der Lipiddoppelschicht integriert werden können (Beckmann *et al.*, 2001). Mit Abschluss der Translation ist das Membranprotein in die ER-Membran integriert und kann, weiteren Sortierungssignalen folgend, über den sekretorischen Weg an die Plasmamembran gelangen. Auffällig an dieser Stelle ist, dass ca. die Hälfte aller im ER prozessierten Proteine im Laufe ihrer Translokation glykosyliert werden (Alberts *et al.*, 2015). Es wird kontrovers diskutiert, ob diese meist N-Glycosylierung als zusätzliches Sortierungssignal fungiert, da ihr zudem auch in weiteren Stadien der Proteinprozessierung, wie der Proteinfaltung, Qualitätskontrolle, ER-assoziierten Degradation und dem ER-Golgi-Trafficking, eine wichtige Rolle zugeschrieben wird (Rodriguez-Boulán & Gonzalez, 1999; Delacour & Jacob, 2006; Potter *et al.*, 2006; Vagin *et al.*, 2008).

Neben dem hier beschriebenen klassischen cotranslationalen Sortierungsweg, gibt es auch noch alternative Wege für die Sortierung in das ER, auf die jedoch erst in **Abschnitt 1.1.4** näher eingegangen wird.

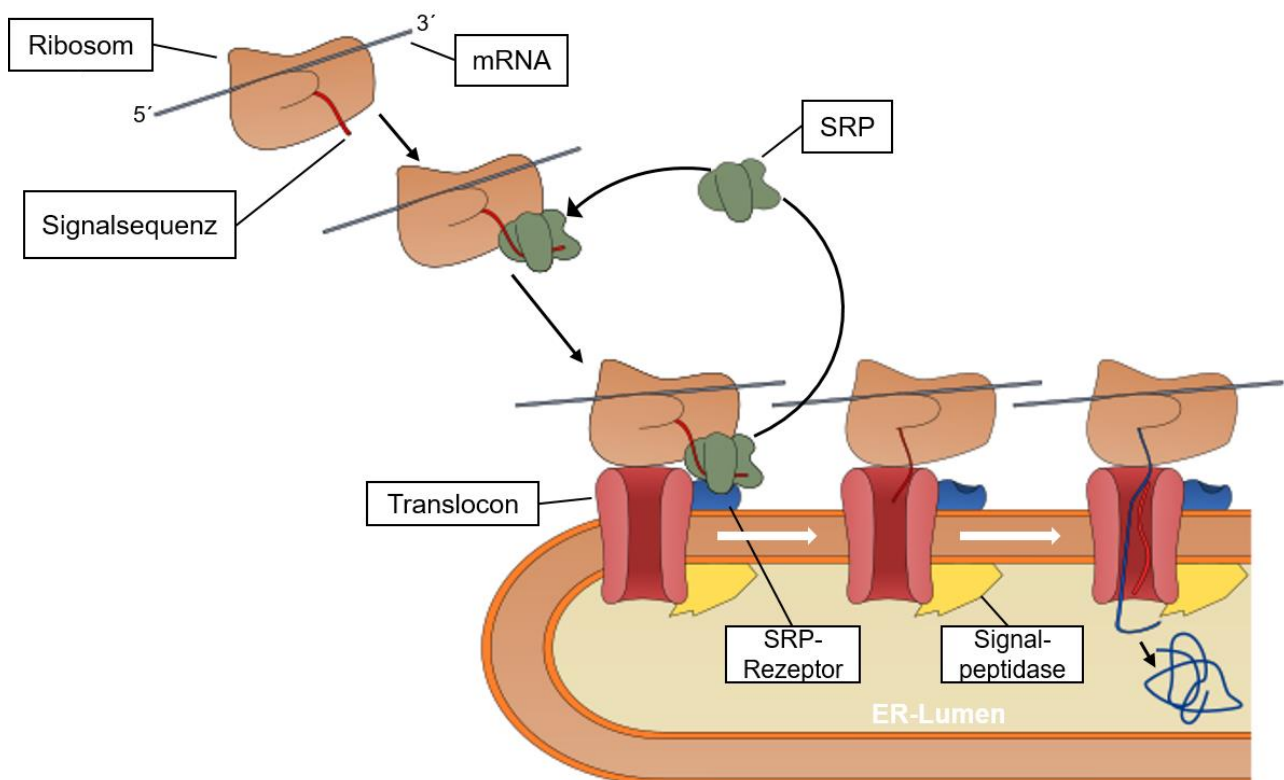


Abbildung 1.1.1: Schema zur cotranslationalen Proteinsortierung in das ER

Die Signalsequenz in dem naszierenden Protein wird von SRP erkannt und gebunden. SRP führt den mRNA-Ribosom-Protein-Komplex an das Translocon (Sec61-Komplex) und den SRP-Rezeptor heran. Das Protein wird daraufhin entweder in die ER-Membran inseriert oder in das ER-Lumen transportiert. (Abbildung abgeändert nach Alberts *et al.*, 2015)

1.1.2. Posttranslationale Proteinsortierung – Proteintransport in die Mitochondrien

Mitochondrien verfügen, ähnlich wie Chloroplasten, über ein eigenes kleines Genom, das vorrangig für Untereinheiten der Atmungskette kodiert. Der Großteil aller Proteine der Mitochondrien ist jedoch kernkodiert und muss aus dem Cytosol importiert werden (Dudek *et al.*, 2013). Zudem bieten Mitochondrien durch ihre Doppelmembran Anlass für eine elaborierte Proteinsortierungs- und Translokations-Maschinerie.

Proteine, die für den Transport in die Mitochondrien vorgesehen sind, werden meist an freien Ribosomen im Cytosol fertig synthetisiert, um durch eine posttranslational agierende Maschinerie in die Mitochondrien transloziert zu werden (Alberts *et al.*, 2015). Dies ist schematisch in **Abbildung 1.1.2** dargestellt. Die meisten so transportierten Proteine tragen eine oder mehrere Signalsequenzen, die ihren Transport in die Mitochondrien oder in eines ihrer Subkompartimente garantieren. Proteine, die für den Transport in die mitochondriale Matrix vorgesehen werden, tragen klassischerweise eine N-terminale Signalsequenz die *mitochondrial targeting sequence* (MTS), die nach Translokation in die Matrix rasch durch eine Signalpeptidase proteolytisch abgespalten und degradiert wird (Taylor *et al.*, 2001). Der Transport von Proteinen, die hingegen in die äußere-, innere-mitochondriale Membran (*outer mitochondrial membrane* = OMM; *inner mitochondrial membrane* = IMM) oder den Intermembranraum (*intermembrane space* = IMS) sortiert werden sollen, tragen interne Signalsequenzen, die nicht abgespalten werden (Alberts *et al.*, 2015).

Um eine spezifische Erkennung durch den mitochondrialen Translokator zu gewährleisten, ist es jedoch vonnöten, dass das Vorläuferprotein nach seiner Synthese im Cytosol nicht aggregiert und es nicht zu einer spontanen Faltung kommt. Dies wird durch die Interaktion mit anderen Proteinen verhindert, die das Vorläuferprotein zum einen vom wässrigen Milieu des Cytosols abschirmt und es zum anderen an das Organell heranführt (Young *et al.*, 2012).

Dabei handelt es sich entweder um cytosolische Chaperone der Hsp70 und Hsp90 (*heat shock protein*) Familie (Murakami *et al.*, 1988) oder um den *mitochondrial import stimulation factor* (MSF), der die MTS spezifisch erkennt und diese gezielt bindet (Hachiya *et al.*, 1994). Der MSF gehört zur Familie der 14-3-3 Proteine. Im Gegensatz zum MSF erkennen Chaperone wie Hsp70 und Hsp90 nicht die MTS, sondern andere hydrophobe Domänen des Vorläuferproteins. An der cytosolischen Glutathion-S-Transferase (GST) GSTA4-4 konnte zudem gezeigt werden, dass Phosphorylierung die Bindungsaffinität von Hsp70 steigert (Robin *et al.*, 2003).

Der Transport der Vorläuferproteine in und über die mitochondrialen Membranen wird über mehrere Protein-Translokatoren vermittelt. Im ersten Schritt des Imports trifft das Chaperon- oder MSF-gebundene Vorläuferprotein auf den TOM-Komplex (*T*ranslokator of the *o*uter *m*embrane), der die mitochondriale *targeting*-Sequenz bindet und die Polypeptidkette, nach Abstreifen der interagierenden

Proteine, in den Translokator-Kanal inseriert. Als primäre „Andockstellen“ und Qualitätskontrollen-Checkpoints dienen hier vorrangig die Untereinheiten Tom20 und Tom70 (Abe *et al.*, 2000; Wu & Sha, 2006). Der TOM-Komplex arrangiert darauf entweder den Transport der Pre-Proteine über die OMM oder die Insertion von Transmembranproteinen in diese. Über den TIM22-Komplex (*Translokator of the inner mitochondrial membrane*) werden Proteine in einen über das Membranpotential getriebenen Mechanismus in die innere mitochondriale Membran integriert (Dudek *et al.*, 2013). Lösliche Proteine, die für die mitochondriale Matrix vorgesehen sind, werden über den TIM23-Komplex durch die IMM transportiert oder Membranproteine lateral in sie inseriert. TIM23 steht auf der Seite der Matrix in Kontakt mit einem multimeren Protein-Komplex, zu dem unter anderem Hsp70 gehört, der hier die Rolle einer Import-ATPase übernimmt, die mittels ATP-Hydrolyse Proteine durch die TIM23-Pore in die Matrix vermittelt (Alberts *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu beruht die laterale Integration von Membranproteinen in die IMM, ähnlich TIM22, auf einem Membranpotential-getriebenen Mechanismus. TIM22 und TIM23 sind strukturell ähnlich, was auf einen gleichen evolutionären Ursprung schließen lässt. Ein weiterer Translokatorkomplex namens SAM-Komplex (*sorting and assembly machinery*) inseriert β -Fass-Proteine, wie Porin, Tom40, Sam50 oder Mdm10 (*mitochondrial dynamics and morphology 10*), in die OMM und vermittelt dort auch deren korrekte Faltung (Dudek *et al.*, 2013).

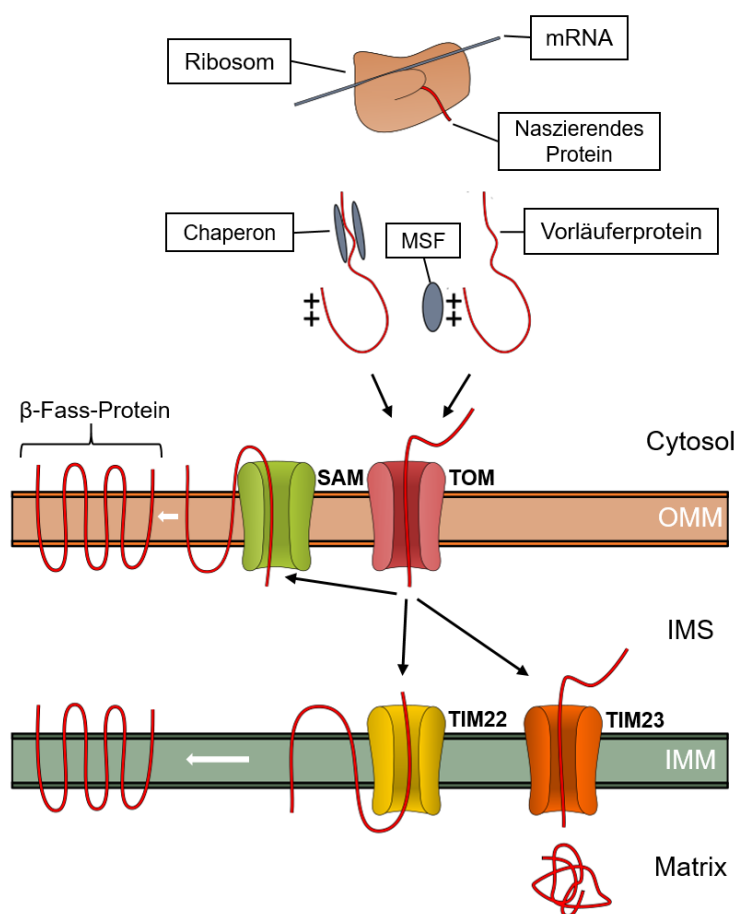


Abbildung 1.1.2: Schema der posttranslationalen Proteinsortierung in die Mitochondrien

Das Protein wird von Chaperonen oder dem MSF gebunden und an das Zielkompartiment, die Mitochondrien, transportiert.

Die Integration des Proteins in die OMM, IMM oder die Matrix geschieht über den TIM/TOM-Komplex.

Neben dem hier beschriebenen klassischen posttranslationalen Sortierungsweg gibt es auch noch alternative Wege für die Sortierung in die Mitochondrien, auf die jedoch erst in **Abschnitt 1.1.4** näher eingegangen wird.

1.1.3. Duales *targeting* von kerncodierten Proteinen

Im Falle von Eukaryoten ist bereits seit längerem bekannt, dass aus einem Gen Proteine hervorgehen können, die in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle lokalisiert sind. In diesem Fall spricht man von dualem *targeting*. Duales *targeting* beruht zum einen auf der Bildung von leicht unterschiedlichen Proteinvarianten, den sogenannten Isoproteinen, zum anderen kann dies jedoch auch auf ein und dasselbe Translations-Produkt zutreffen (Regev-Rudzki & Pines, 2007). Im ersten Fall kann es bei verschiedenen Stadien der Proteinbiosynthese zur Entstehung von Isoproteinen kommen:

- (1) Auf Ebene der Transkription können durch mehrere Transkriptioninitiationsstellen unterschiedlich lange mRNAs und somit Isoproteine entstehen.
- (2) Auf Ebene der prä-mRNA kann es durch alternatives Spleißen und somit unterschiedlichen mRNAs, die translatiert werden, zur Bildung von Isoproteinen kommen.
- (3) Auf Ebene der Translation entstehen unterschiedlich lange Proteinvarianten, wenn es mehrere sich im Leserahmen befindliche Startcodone gibt, an denen die Translation beginnen kann.

All diese Möglichkeiten führen zu Isoproteinen, die sich durch die Existenz oder Absenz einer *targeting*-Sequenz unterscheiden können.

Im Folgenden sollen Beispiele für jeden dieser Modi besprochen werden, um im Anschluss auf das Duale-*targeting* eines Translations-Produkts einzugehen.

Zu (1): PHGPx (Phospholipid-Hydroxyperoxid-Glutathion-Peroxidase)

PHGPx wird im Zytosol (cPHGPx), in den Mitochondrien (mPHGPx) und dem Zellkern (nPHGPx) exprimiert, wobei zunächst davon ausgegangen wurde, dass die nukleare Isoform von PHGPx dort aufgrund von Splicing-Varianten der mRNA lokalisiert ist. Maiorino *et al.* (2003) konnte jedoch in *silico* Versuchen zeigen, dass es zwei Promotor-Regionen gibt, wobei eine die Bildung der cPHGPx und mPHGPx Isoproteine vermittelt, und die andere die der nPHGPx. Es gilt anzumerken, dass die Expressionslevels der einzelnen Isoproteine höchst gewebespezifisch sind.

Zu (2): Grx (Glutaredoxin)

Glutaredoxin ist ein Glutathion-abhängiger Wasserstoffdonor der Ribonukleotidreduktase. Neben dem lange bekannten humanen, zytosolisch lokalisierten, 12 kDa großen Grx1, wurde das neue 18 kDa große Grx2 entdeckt. Das Grx2-Gen besitzt fünf Exons, die zu zwei alternativ gesplizierten Grx2 mRNA-Isoformen führen, die sich wiederum in ihrer 5'-Region unterscheiden. Die daraus entspringenden Isoenzyme tragen unterschiedliche 39 bzw. 40 Aminosäuren-lange N-terminale Anhänge, wobei einer als MTS fungiert und der andere nicht. Dies führt bei Jurkats zu einer Lokalisation von Grx2, sowohl in den Mitochondrien als auch im Nukleus (Lundberg *et al.*, 2001).

Zu (3): IDE (*Insulin-degrading enzyme*)

Bei IDE handelt es sich um eine Zink-Metalloproteinase, die sowohl das zerebrale β -Amyloid als auch den Insulin-Pegel im Plasma reguliert. Im offenen Leserahmen der cDNAs von IDE in Säugetieren liegen zwei potenzielle Translationsinitiationsstellen (Met1 und Met42). Diese führen dazu, dass eine Proteinvariante einen um 41 Aminosäuren (AS) verlängerten N-Terminus (Met1-IDE) hat als die andere (Met42-IDE). Der verlängerte N-Terminus von Met1-IDE fungiert als MTS und dirigiert Met1-IDE in die Mitochondrien, wohingegen Met42-IDE in Geweben und kultivierten Zellen im Zytoplasma lokalisiert ist. Das Übergehen des Ribosoms der ersten Translationsinitiationsstelle beruht auf der Sequenzähnlichkeit der AUG-flankierenden Sequenzen zur Kozak-Sequenz. Es wird vorausgesagt, dass Met42-AUG eine bessere Kozak-Konsensussequenz umgibt und es konnte experimentell gezeigt werden, dass Met42-AUG in der Tat die effizientere Translationsinitiationsstelle ist (Leissring *et al.*, 2004).

Dies waren alles Beispiele für Duales *targeting* von zwei oder mehreren Isoenzymen. Im Weiteren soll es darum gehen zu klären, wie ein und dasselbe Translations-Produkt in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert ist.

Auch hierfür gibt es einige bereits mehrfach belegte Möglichkeiten (Karniely & Pines, 2005; Regev-Rudzik & Pines, 2007):

- I. Ein Protein verfügt über mehrere separate Signalsequenzen, die miteinander konkurrieren.
- II. Ein Protein trägt eine mehrdeutige Signalsequenz, die das *targeting* mehrerer Zellkompartimente ermöglicht.
- III. Ein Protein wird ineffizient sortiert oder das Sortierungssignal ist aufgrund von Faltung, Bindung eines anderen Proteins oder Protein-Modifikation unzugänglich.

Ausgesuchte Beispiele werden nun zu jeder Möglichkeit des Dualen *targetings* im Falle nur eines Translations-Produkts aufgezeigt.

Zu I.: Catalase A

Die Catalase A verfügt über zwei Signalsequenzen; eine N-terminale MTS und ein C-terminales peroxisomal-ähnliches *targeting*-Signal (PTS1) (Petrova *et al.*, 2004). Je nach Kohlenstoffquelle des Mediums ändert sich die präferierte Lokalisation der Catalase A zwischen Mitochondrien (Raffinose) und Peroxisomen (Oleat) in Hefen (Petrova *et al.*, 2004).

Zu II.: pGR- Glutathion-Reduktase

In diesem Fall ist die Lokalisation abhängig vom Wettbewerb der Organellen um das Sortierungssignal. Häufig ist dieser Typ des Dualen *targeting* für pflanzliche Proteine beschrieben, die ein mehrdeutiges Sortierungssignal für das *targeting* in die Mitochondrien und Chloroplasten aufweisen (Silva-Filho, 2003). So zum Beispiel auch bei der Glutathion-Reduktase der Erbse (Rudhe *et al.*, 2002). Peeters und Small (2001) haben die Eigenschaften und Zusammensetzung 19 mehrdeutiger Sortierungssequenzen mit bekannten mitochondrialen und chloroplastidalen Sortierungssignalen verglichen und festgestellt, dass ihre Aminosäurezusammensetzung im Vergleich weniger Alanine, jedoch mehr Phenylalanine und Leucine aufweist. Dennoch konnte bisher noch keine klare Regel für den Aufbau und die Auslese mehrdeutiger Sortierungssignale gefunden werden.

Zu III.:

a) Proteinfaltung

Bei Aky2p (Adenylatkinase 2) handelt es sich um die Haupt-Adenylatkinase in Hefen. Sie ist sowohl im Zytosol als auch im mitochondrialen Intermembranraum (IMS) lokalisiert. Zwar hat Aky2p keine abspaltbare MTS, dennoch ist eine 18 aminosäurenlange, am N-Terminus gelegene Sequenz, für den Transport in die IMS verantwortlich. Bandlow *et al.* (1998) haben postuliert, dass das *targeting* der Mitochondrien faltungsabhängig ist, da Aky2p sich spontan und schnell faltet. Somit wird Aky2p in die Mitochondrien sortiert, wenn die Signalerkennung schneller eintritt als die spontane Faltung von Aky2p. Die Faltung bedingt somit in diesem Fall das Verbleiben von Aky2p im Zytosol, da das mitochondriale Sortierungssignal unzugänglich geworden ist.

b) Proteinbindung

Apn1 (Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1) ist ein wichtiges DNA-Reparatur-Enzym, sowohl im Zellkern als auch in den Mitochondrien. Das Duale *targeting* beruht auf einem C-terminalen *nuclear localization signal* (NLS) und einer putativen MTS am N-Terminus (Vongsamphanh *et al.*, 2001). Interargiert Apn1 mit Pir1, einem Zellwandprotein, maskiert Pir1 höchstwahrscheinlich das NLS und Apn1 wird vorrangig in die Mitochondrien sortiert. Es ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, ob

Pir1 nicht nur den Import in den Zellkern verhindert, sondern auch eine Bevorzugung des mitochondrialen Transports vermittelt (Vongsamphanh *et al.*, 2001).

c) Proteinmodifikation

Das Duale *targeting* aufgrund von posttranslationaler Proteinmodifikation kann auf sehr unterschiedlichen Wegen entstehen. Einige Beispiele werden im Folgenden beschrieben.

CYP2B1 (Cytochrom P4502B1) ist aufgrund einer zweiteiligen Sortierungssequenz am N-Terminus im ER und den Mitochondrien lokalisiert. Die posttranslationale cAMP-abhängige Phosphorylierung einer internen Proteinkinase A (PKA) Signatursequenz (Ser129) von CYP2B1 induziert die Interaktion zwischen dem zytosolischen Chaperon Hsp70 und einer cryptischen MTS und führt somit zu einem Import in die Mitochondrien (Anandatheerthavarada *et al.*, 1999; Robin *et al.*, 2002).

CYP1A1 (Cytochrom P4501A1) hat ein zweiteiliges Sortierungssignal am N-Terminus und wird entweder in die Mitochondrien oder das ER sortiert. Durch eine zytosolische Protease wird die ER-*targeting*-Sequenz endoproteolytisch abgespalten und CYP1A1 daraufhin in die Mitochondrien importiert (Addya *et al.*, 1997).

Die große Auswahl an gezeigten Beispielen spiegelt nur ansatzweise das Spektrum der bis dato bekannten Mechanismen und Faktoren, die Duales *targeting* hervorrufen, weswegen dieser Bereich weiterhin von großem Interesse für die Forschung ist.

1.1.4. Alternative Proteinsortierungswege

Neben den in den **Abschnitten 1.1.1** und **1.1.2** beschriebenen klassischen Proteinsortierungswegen in die Mitochondrien und in das ER, gibt es noch Mechanismen, die zwar auch als co- bzw. posttranslational eingeordnet werden können, jedoch eher als alternative Wege der Proteinsortierung gelten.

Proteine können dementsprechend zwar zunächst cotranslational in den sekretorischen Weg sortiert werden, jedoch ist ihr Zielkompartiment nicht das ER, sondern die Mitochondrien. Der mitochondriale Import geschieht im Fall dieser Proteine über ein Subkompartiment des ERs, den sogenannten *mitochondrial associated membranes* (MAMs). Die MAMs interagieren aufgrund ihrer großen räumlichen Nähe (10-25 nm) zur mitochondrialen Membran mit deren OMMs (Csordás *et al.*, 2006). MAMs spielen eine wichtige funktionelle Rolle in Bezug auf den Ca²⁺- und Lipid-Transfer zwischen ER und Mitochondrien. Sie haben jedoch auch Einfluss auf die Form, Bewegung, den Energie-Metabolismus und Redox-Status von Mitochondrien und nehmen eine Schlüsselrolle in ER-Stress, Autophagie und der Signalweiterleitung an das Inflammasom ein (van Vliet *et al.*, 2014). Ein Virus, das sich die MAMs zunutze macht, ist das humane Cytomegalovirus (HCMV). Sein Protein UL37 *exon 1* (pUL37x1) wird

über die MAMs in die OMM inseriert und inhibiert dort die Apoptose (Arnoult *et al.*, 2004; Williamson *et al.*, 2011).

Eine wenig bekannte Proteinklasse, die zwar posttranslational sortiert, jedoch für verschiedene Membranen (ER-Membran, OMM, äußere Chloroplasten-Membran und Peroxisomen-Membran) vorgesehen sind, sind die *tail-anchored* Proteine (TA-Proteine) (Borgese & Fasana, 2011).

TA-Proteine bestehen aus einer zytosolischen N-terminalen Region und einer Transmembrandomäne (TMD) nahe des C-Terminus, die als Membran-Anker fungiert. Aufgrund ihrer Struktur und der Tatsache, dass ihre TMD als einziger *targeting* Faktor fungiert, ist eine Erkennung der Signalsequenz erst mit Abschluss der Translation, möglich was eine cotranslationale Erkennung durch das SRP verbietet. Der Transport von TA-Proteinen in das ER kann ohne Hilfe von Faktoren oder Chaperonen geschehen. Für Säugetiere und Hefen konnte jedoch auch ein Chaperon-System, der sogenannte *transmembrane recognition complex* (TRC) bzw. *guided entry of tail-anchored proteins* (Get) entdeckt werden, das den Transport in die ER-Membran vermittelt (Stefanovic & Hegde, 2007; Borgese & Fasana, 2011). Ein Beispiel für den Import eines Proteins ohne weitere Unterstützung in einen Phospholipid Bilayer ist das Cytochrom b(5), dessen Import auf der Hydrophobizität seiner TMD beruht (Brambillasca *et al.*, 2006). Stefanovic und Hegde (2007) beschrieben erstmals eine zytosolische Untereinheit des TRC, eine 40 kDa große ATPase (TRC40), und indentifizierten sie als Asna-1. TRC40/Asna-1 erkennt die TMD des TA-Proteins und interagiert daraufhin mit einem Protein-Rezeptor in der ER-Membran (Stefanovic & Hegde, 2007). Das TA-Protein wird im weiteren Verlauf unter der Hydrolyse von ATP in die OMM inseriert (Stefanovic & Hegde, 2007). Durch verschiedene Studien konnten mehrere Komponenten des TRC identifiziert werden (TRC40, WRB, TRC35, Ubl4A, Bat3, SGTA), deren Rolle im Verlauf des Transports von TA-Proteinen jedoch teilweise nicht abschließend verstanden ist (Borgese & Fasana, 2011).

Kesv, der Kanal der hier bearbeitet wird, wird nach Modifikation ein *target* für den Get4-5 Faktor und folgt in Hefen somit dem Get-Pathway (Zhang *et al.*, 2016).

Neben den bereits genannten klassischen SRP-anhängigen und dem alternativen Sortierungsweg für TA-Proteine in das ER, wurde in den letzten Jahren ein weiterer alternativer SRP-unabhängiger und nicht zwangsläufig cotranslationaler Sortierungsweg als *Pathway* in Hefen identifiziert. Dieser Weg benötigt zytosolische Chaperone (Wilkinson *et al.*, 1997), einen heptamerischen Membranprotein-Komplex (Sec61- & Sec63-Komplex) und Komponenten im Lumen (BiP & Lhs1p) (Vogel *et al.*, 1990; Craven *et al.*, 1996; Tyson & Stirling, 2000). In Hefen interagiert das Vorläuferprotein posttranslational unter Aufwendung von ATP mit dem heptameren Sec-Komplex. In Hefen können sekretorische Proteine in drei Klassen bezüglich ihrer Sortierung eingeteilt werden; SRP-abhängige, SRP-unabhängige und jene, die beide Wege nutzen. Dies scheint abhängig von ihrer Signalsequenz zu sein (Ng *et al.*, 1996).

Diese Aufstellung ist nur als kleiner Überblick über das höchstwahrscheinlich noch viel weitere Spektrum der möglichen alternativen Sortierungswege zu bewerten, weswegen dieses Forschungsfeld auch in Zukunft von großem Interesse bleiben wird.

1.2. Signalsequenzen

Die Erkenntnis, dass der gezielte Transport sekretierter Proteine über eine abspaltbare N-terminale Signalsequenz mediert wird, bedeutete 1975 einen großen Durchbruch in der Zellbiologie (Blobel & Dobberstein, 1975). In den folgenden >40 Jahren der Forschung wurde zunächst postuliert, dass jene Signalsequenzen über ein klares, wiederkehrendes Aminosäuren-Motiv verfügen.

Diese Hypothese muss jedoch zeitnah verworfen werden, da, ähnlich groß wie die Varianz der Sortierungswege, auch die Varianz der Struktur und Lage von Signalsequenzen sein kann.

Grundsätzlich kann man Signalsequenzen jedoch als Abschnitte bezeichnen, die zwischen drei und 80 Aminosäuren lang sind und meist im Cytosol durch spezifische Rezeptoren oder Chaperone erkannt werden. Eine der am besten erforschten Signalsequenz ist die, die Proteine für den ER-Import markiert. Klassischerweise bestehen diese Signalsequenzen aus 5-10 hydrophoben, N-terminal-gelegenen Aminosäuren und werden nach Erkennung durch das SRP über eine Signal-Peptidase abgespalten (Ng *et al.*, 1996). Nach dem Import in das ER wird das weiterführende Sortierungsschicksal durch weitere interne Signalsequenzen bestimmt. Ein großer Anteil jener Proteine wird zur weiteren Verteilung an den Golgi-Apparat weitergegeben. Proteine, die jedoch im ER verbleiben sollen, zeichnen sich durch eine am C-Terminus gelegene, kurze Retentionsssequenz (KDEL) aus, wohingegen ein diazides Motiv (DXE, EXE) für einen ER-Export charakteristisch ist (Alberts *et al.*, 2015; Nishimura & Balch, 1997; Mikosch *et al.*, 2006).

Proteine, die für den Import in die Mitochondrien vorbestimmt sind, tragen klassischerweise eine *mitochondrial targeting sequence* (MTS) am N-Terminus. Hierbei wechseln sich über eine Länge von 20 - 80 Aminosäuren positiv geladene und ungeladene hydrophobe Aminosäuren ab, wodurch eine amphipatische α -Helix gebildet wird (Lithgow, 2000). Neben den bisher genannten N-terminal-gelegenen Signalsequenzen gibt es noch weitere Signalsequenzen, deren Lage am C-Terminus charakteristisch ist. So wird der Import in Peroxisomen durch eine kurze C-terminale Aminosäureabfolge (SKL) vermittelt. Der cytosolische Rezeptor Peroxin Pex5 erkennt diese kurze Sequenz und begleitet das Protein an das Peroxisom (Alberts *et al.*, 2015; Gould *et al.*, 1987). Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass auch manche peroxisomale Proteine durch eine N-terminale Sortierungssequenz in das Peroxisom gelangen (Fujiki *et al.*, 2014).

Wie bereits unter **Abschnitt 1.1.3** angesprochen, treten auch zweiteilige oder mehrdeutige Signalsequenzen auf, die zu Dualem *targeting* führen können.

In den meisten Fällen erkennen Translokationsproteine weniger die genaue Aminosäureabfolge, als vielmehr die Strukturbildung und die Eigenschaften der in der Signalsequenz befindlichen Aminosäuren. Dies führt zu einer großen Varianz innerhalb der Signalsequenzen, die jedoch weiterhin spezifisch für ein Zellkompartiment sind.

1.3. *Codon usage*

Es ist allgemein bekannt, dass der genetische Code redundant ist, da 64 auf einen 3-Buchstaben Code beruhende Basentriplets, die sogenannten Codone, für lediglich 20 Aminosäuren und drei Stopcodone codieren. Somit werden mehrere synonyme Codone in ein und dieselbe Aminosäure übersetzt. Auf dieser Grundlage basiert auch das Phänomen der *codon usage* oder auch des *Codon Bias*, womit die Tatsache beschrieben wird, dass Codone in einem Genom, je nach Spezies, unterschiedlich häufig verwendet werden. Dies führt unter anderem zu einer Einordnung der Codone als optimale und nicht-optimale Codone, die grundsätzlich auf einer Funktion zwischen der stochastischen Erkennung des Codons durch das Ribosom und der Variabilität der tRNA-Verfügbarkeit basiert. Somit beruht die Klassifizierung der Codone auf der Effizienz, mit der die passende tRNA aus dem cytosolischen Pool der tRNAs auf das abzulesende Codon in der ribosomalen A-Stelle trifft. Für viele bekannte Modellorganismen wie z. B. *Escherichia coli* (Ikemura, 1981), *Saccharomyces cerevisiae* (dos Reis *et al.*, 2004), *Caenorhabditis elegans* (Duret, 2000) und *Drosophila* spp. (Moriyama & Powell, 1997) sowie auch bei Eukaryoten (Sabi & Tuller, 2014) konnte festgestellt werden, dass der *Codon Bias* mit der tRNA-Verfügbarkeit korreliert. Stark exprimierte Gene werden bevorzugt von Codonen mit einem hohen *Codon Bias* sowie einer guten tRNA-Verfügbarkeit kodiert (Sharp *et al.*, 1986; Dong *et al.*, 1996; Roth, 2012; Bazzini *et al.*, 2016). Zudem konnte Presnyak *et al.* (2015) zeigen, dass optimalere Codone auch stabilere mRNAs bilden.

Man geht davon aus, dass die Abfolge synonyme Codone nicht zufällig vom Transkriptom gewählt wird, sondern durch unterschiedliche Verteilung optimaler und nicht-optimaler Codone quasi eine weitere regulatorische Ebene hinzugefügt wird (Hanson & Collier, 2018). Ihr Einfluss auf die generelle Gen-Expression, die Regulation der ribosomalen Translation bis hin zur Proteinfaltung wird daher weit diskutiert (Hanson & Collier, 2018). So gilt die Annahme, dass optimale Codone eine effizientere Translation durchlaufen, da der geschwindigkeitlimitierende Schritt der Elongation durch eine höhere tRNA-Verfügbarkeit verringert wird. Dies konnte durch Experimente mittels *ribosomal profiling* bestätigt werden, da Ribosome kürzer an Codonen verweilen, die eine gute tRNA-Verfügbarkeit aufweisen (Husmann *et al.*, 2015). Zudem konnte dieser Effekt auch in Echtzeit beobachtet werden, da eine optimierte mRNA (1,6 kb) in einem zellfreien System 1,5 Minuten schneller translatiert wurde als die nicht-optimierte Kontrolle (Yu *et al.*, 2015). Nicht-optimale Codone hingegen führen zu einer

Reduzierung der ribosomalen Translokationsrate; dies kann zu Kollisionen zwischen Ribosomen am abzulesenden mRNA-Strang führen und damit auch zu einem verlangsamten Translationsbeginn, da die Initiationsstelle länger besetzt bleibt (Chu *et al.*, 2014). Mit optimalen Codonen geht jedoch auch eine größere Stabilität der Sekundärstruktur der mRNA einher, wodurch mehr Energie aufgebracht werden muss, um die mRNA zu entfalten und für die Translation verfügbar zu machen (Kudla *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2010; Tsao *et al.*, 2011). In einem zellfreien System konnte jedoch auch beobachtet werden, dass eine codonoptimierte Luciferase mRNA zwar schneller translatiert wird als die Wildtyp-Kontrolle, jedoch der größere Anteil der produzierten Proteine nicht funktional war. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Optimierung der Codone über das gesamte Gen hinweg zu Fehlfaltungen führt und strukturelle Schlüsselpositionen weniger optimale Codone benötigen, um eine korrekte cotranslationale Faltung zu ermöglichen (Yu *et al.*, 2015; Spencer *et al.*, 2012). Somit ist ein bestimmtes Abfolgemuster von optimalen und nicht-optimalen Codonen unabdingbar für eine korrekte, cotranslationale Faltung mancher Proteine.

Abschließend ist zu sagen, dass es zunehmend mehr Beweise gibt, die zeigen, dass *codon usage* ausschlaggebend in der koordinierten Expression von funktionell verwandten Genen ist, und es zudem starke Hinweise dazu gibt, dass die Genexpression durch dynamische tRNA-Konzentrationen an die Bedürfnisse der Zelle oder des Gewebes moduliert werden kann (Hanson & Collier, 2018).

1.4. Virale Ionenkanäle als Modellsysteme

Viren sind in ihrer Existenz von zellulären Prozessen ihres Wirtes abhängig. Aufgrund ihrer minimalen genomischen Ausstattung, nutzen die meisten Viren für jeden Schritt ihres Lebenszyklus die höchst elaborierte zelluläre Maschinerie der höheren Organismen, die sie befallen. Diese starke Abhängigkeit macht die Virus-Wirt-Interaktion zu einem bewährten System, um nicht nur den Virus und z. B. seinen Infektionsprozess zu untersuchen, sondern auch, um zelluläre Mechanismen des Wirtes besser zu verstehen oder gar zu entdecken. So konnte die Existenz des diaziden ER-Exportmotives DXE erstmals durch die Untersuchung des Infektionsprozesses des humanpathogenen *vesicular stomatitis virus* (VSV) und durch Mutationsstudien am C-Terminus des VSV-Glykoproteins (VSV-G) bestimmt werden (Nishimura & Balch, 1997). Über Jahrmillionen der Koevolution haben Viren ihr Genom zu einem höchst robusten, jedoch gleichzeitig minimalistischen System entwickelt. Dies macht Viren zu einer interessanten Quelle von Proteinen mit minimaler Struktur. Diese Proteine bilden ein breites Spektrum, das von einer ATP-abhängigen DNA-Ligase bis hin zu einer RNA-capping-Guanylyltransferase reicht (Ho *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1996). Unter anderem, und im Fokus dieser Arbeit, befinden sich unter den gefundenen minimalen Proteinen auch Ionenkanäle, die in ihrer Ausstattung zwar weitestgehend minimal sind, in ihrer Funktion ihren „großen“ Partnern jedoch in nichts nachstehen. So dient z. B. der aus lediglich 82 AS bestehende K⁺-Kanal Kcv_{NTS} als solides Modellsystem zur Untersuchung der

Protein/Bilayer-Interaktion, da er aufgrund seiner minimalen Größe fast vollständig im Lipid-Bilayer eintaucht (Braun *et al.*, 2014). Durch Studien am minimalen viralen K⁺-Kanal KcV_{PBCV-1}, der in seiner Struktur alle Elemente des Porenmoduls aller funktionalen K⁺-Kanäle enthält, konnte unter anderem auch eine Ba²⁺-Bindestelle im Filter von Kcv identifiziert werden, die so auch in den komplexeren Kir-Kanälen vorhanden ist (Chatelain *et al.*, 2009). Wie bereits angedeutet, gibt es einige Fälle, in denen über die Untersuchung der Sortierung von viralen Proteinen Licht auf die Sortierungswege zellulärer Proteine geworfen werden konnte. Neben bis dahin unbekannten Wegen der Endozytose oder der bereits genannten Entdeckung eines ER-Export-motives könnten Lokalisationsstudien an viralen K⁺-Kanälen sowohl Aufschluss auf die zelluläre Sortierungsmaschinerie als auch auf die sortierungsbestimmende Funktion bestimmter Proteinabschnitte in komplexeren Proteinen geben (Pelkmans & Helenius, 2003; Nishimura & Balch, 1997; Thiel *et al.*, 2011). Dies soll im folgenden Abschnitt am Beispiel der viralen Kaliumkanäle Kcsv und KcV_{PBCV-1} näher erläutert werden.

1.4.1. Die viralen Kaliumkanäle Kcsv und KcV_{PBCV-1}

In diesem Abschnitt wird kurz auf Kaliumkanäle im Allgemeinen eingegangen, um dann genauer die beiden viralen Kaliumkanäle Kcsv und Kcv zu beschreiben.

Kaliumkanäle befinden sich hauptsächlich in der Plasmamembran, sind jedoch auch in intrazellulären Membranen verschiedener Organellen wie den Mitochondrien, dem ER oder den Lysosomen vertreten (Szewczyk *et al.*, 2009; Salari *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017).

Grundsätzlich lässt sich die Familie der Kaliumkanäle entweder über ihre Art des *gatings* oder über ihre Struktur weiter unterteilen. Als *gating* wird der stochastische Wechsel zwischen dem offenen und geschlossenen Zustand eines Ionenkanals bezeichnet (Hille, 2001). Das *gating* kann von verschiedenen Faktoren oder Stimuli abhängig und durch diese modulierbar sein. So charakterisiert man Kaliumkanäle anhand ihres *gatings* z. B. als spannungsabhängig (K_v-Kanal), Calcium-aktiviert (BK-Kanäle) oder G-Protein-gekoppelt (GIRK-Kanäle) (Miller, 2000; Soto *et al.*, 2002; Lewohl *et al.*, 1999).

Die Struktur aller Kaliumkanäle basiert grundsätzlich auf derselben Architektur: Zwei oder vier identische Untereinheiten lagern sich als Tetramer oder Dimer zusammen und bilden so eine wassergefüllte zentrale Pore, durch die der Ionenübertritt über die Membran katalysiert wird (MacKinnon, 2003).

Über die Struktur ihrer Untereinheiten geschieht die Einteilung der Kaliumkanäle in vier Hauptklassen (siehe **Abbildung 1.4.1**).

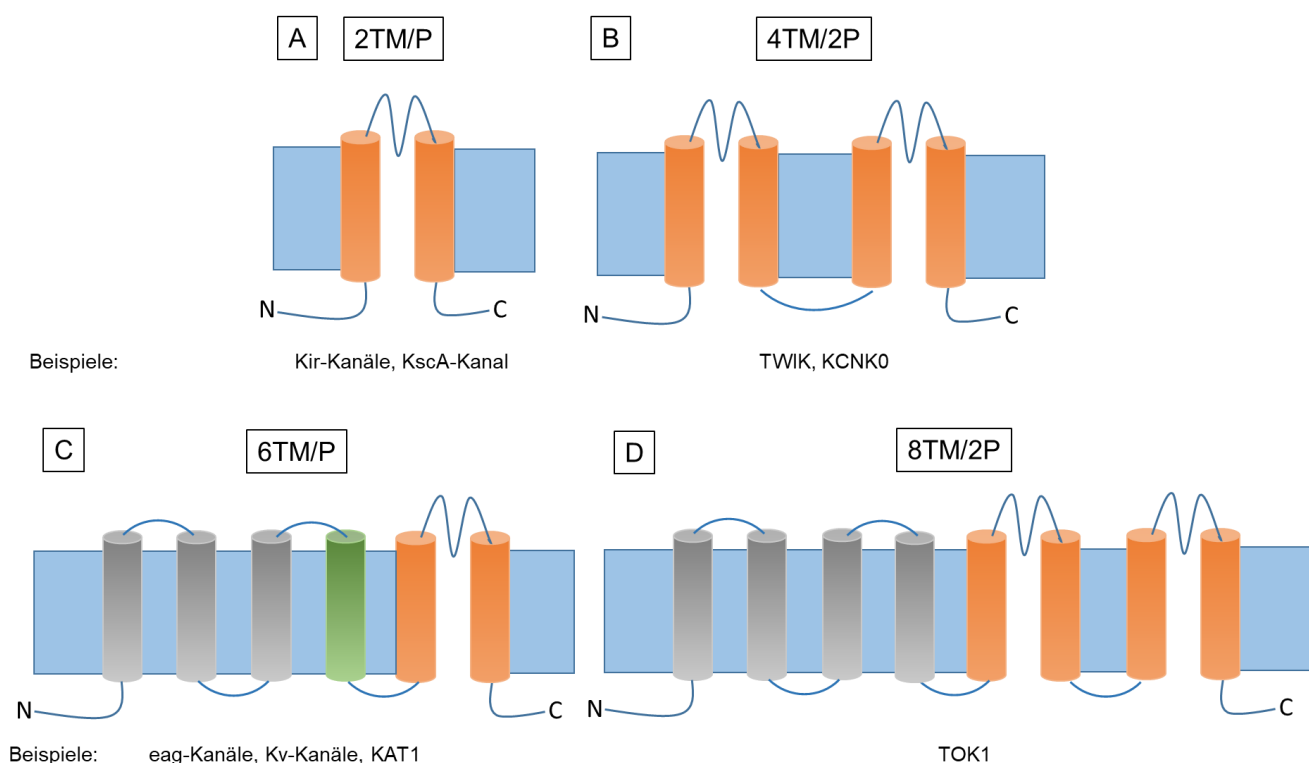


Abbildung 1.4.1: Kaliumkanal-Hauptklassen und bekannte Beispielkanäle

Dargestellt sind die strukturellen Hauptklassen der Kaliumkanäle. Die Porendomänen (orange) werden aus zwei Transmembrandomänen (TM) und einem P-loop (P) gebildet. Zusätzliche Transmembrandomänen sind in grau gezeigt. Die grüne TM bei der Hauptklasse C 6TM/P kennzeichnet die Lage des Spannungssensors (S4) bei spannungsabhängigen Kanälen. N und C kennzeichnen den Amino- und Carboxyl-Terminus der Untereinheit.

Ein funktionaler Kaliumkanal besteht stets aus vier Porendomänen (P), die jeweils aus einer Porenhelix und einer hochkonservierten Konsensussequenz TXXTXGYG/FG, die auch Signatursequenz genannt wird, gebildet werden (Doyle *et al.*, 1998). Die Signatursequenzen der vier Porendomänen bilden gemeinsam den Selektivitätsfilter. Der Selektivitätsfilter ermöglicht den K^+ -selektiven Ionenfluss, der mit 10^7 -Ionen pro Sekunde der freien Diffusion in Wasser nahe kommt (Hille, 2001).

Die Hauptklassen A und C bilden aus ihren Untereinheiten Tetramere, wohingegen die Hauptklassen B und D aufgrund ihrer doppelten Porendomäne Dimere ausbilden (siehe **Abbildung 1.4.1**).

Der in dieser Arbeit untersuchte Kesk Kanal (Kaliumkanal Ecotocarpus siliculosus Virus) zeigt in seiner Aminosäuresequenz alle wichtigen strukturellen Voraussetzungen eines putativen Kaliumkanals. Seine 124 lange Aminosäuresequenz, die aus dem ORF-223 (*open reading frame*) des Ecotocarpus siliculosus Virus 1 (EsV-1) abgeleitet wurde, trägt zum einen die K^+ -Kanal charakteristische Signatursequenz; zum anderen ist sie von hydrophoben Bereichen umgeben, die als Transmembrandomänen interpretiert werden können. Der potenziell funktionelle Kesk bildet also höchst wahrscheinlich ein Tetramer aus 2TM/P strukturierten Untereinheiten (siehe **Abbildung 1.4.1**).

Die erste elektrophysiologische Charakterisierung wurde von Mehmel (2004) durchgeführt, wobei dieser feststellen konnte, dass die Pore von Kev in einer Chimäre mit den Transmembrandomänen von Kcv einen K^+ -selektiven Kanal bilden kann. Eine elektrophysiologische Charakterisierung des Wildtypproteins war weder nach heterologer Expression in Oozyten von *Xenopus laevis* noch in Säugerzellen wie HEK293 (*human embryonic kidney cells*) und auch nicht in CHO-K1 (*chinese hamster ovary cells*) Zellen möglich. Dies wurde dadurch erklärt, dass Kev nach heterologer Expression nicht an die Plasmamembran transportiert wird, sondern, wie später von Balss (2007) näher untersucht, in den Mitochondrien lokalisiert ist.

Für Kev wird eine N-terminal gelegene putative MTS vorausgesagt, die, typisch für diese Signalsequenz, reich an positiv geladenen Aminosäuren ist (siehe **Abbildung 1.4.2**).

```

Kev  MSRRLFATCGIAIALRGLVVSGGVKEIVSFRPLIDTSLVGGILSNLILLVVF AELYWQLDQG
Kcv  -----MLVFSKFLTRTEPFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF
      :  :  .*  .  :  :  :  :  :  :  :  :
Kev  DDHTHFGFSSAIDAYYFSAVTSSSVGYGDLLPKTPKAKLLTIAHILAMFFVMLPVVAKALEK  124
Kcv  SVANPDKKASWIDCIYFGVTTHSTVGFGDILPKTTGAKLCTIAHIVTVFFIVLTL-----  94
      .  .  :  *  **  .  **  .  .  *  *  :  *  :  *  *  .  *  *  *  *  :  :  *  :  *  :  :

```

Abbildung 1.4.2: Alignment der Aminosäuresequenz von Kev und Kcv_{PBCV1}

Der Selektivitätsfilter ist gelb hinterlegt und die Aminosäuren der TMs rot markiert. Die für Kev vorhergesagte MTS ist grau hinterlegt. Sterne markieren gleiche, Punkte und Doppelpunkte markieren konservierte und semikonservierte Aminosäuren der beiden verglichenen Kanäle.

Balss (2007) konnte zeigen, dass es sich bei diesem Sequenzabschnitt tatsächlich um eine MTS handelt, die, alleine an GFP fusioniert, ausreicht um dieses fluoreszierende Protein in die Mitochondrien zu sortieren. Die MTS ist jedoch nicht nötig, um Kev in die Mitochondrien zu transportieren, da eine Kev-Mutante frei von der MTS dennoch in die Mitochondrien sortiert wird. Weitere Mutationsstudien an der zweiten TMD von Kev zeigten, dass diese unabdingbar für ein gezieltes mitochondriales *targeting* ist. Die Insertion von zwei Valinen an Stelle 113 von Kev führt zu einem Verlust der mitochondrialen Sortierung und zu einer Umleitung von Kev an die Plasmamembran (Balss *et al.*, 2008).

Zhang *et al.* (2016) konnten zeigen, dass Kev durch die Verlängerung der zweiten TMD an der Stelle 113 zu einem Substrat des Get-Pathways in Hefen wird und Kev 113 VV somit von der zellulären Sortierungsmaschinerie als *tail-anchored*-Protein erkannt wird.

Sowohl von Balss (2007) als auch von Chappuis (2013) wurden Lokalisationsstudien von K_{esv} im Vergleich mit K_{cv}_{PBCV1} angefertigt, da sich K_{esv} und K_{cv}_{PBCV1} strukturell stark ähneln, sich aber in Bezug auf ihre Lokalisation vollkommen unterschiedlich verhalten.

K_{cv} entstammt dem 330 kb großen Genom des Chlorella Virus PBCV-1 (*Paramecium bursaria* Chlorella Virus), das wie EsV-1 zu der Familie der *Phycodnaviridae* gehört (van Etten, 2003). Das durch Sequenzierung des Genoms gefundene Protein ist 94 AS lang und trägt, wie K_{esv}, alle Charakteristika von prokaryotischen und eukaryotischen K⁺-Kanälen und wurde deshalb K_{cv}_{PBCV1} benannt, was für K⁺-Kanal aus dem Chlorella Virus steht (Plugge *et al.*, 2000). Im Folgenden wird K_{cv}_{PBCV1} nur noch als K_{cv}, ohne den Zusatz PBCV-1, bezeichnet.

K_{cv} bildet, wie K_{esv}, ein Tetramer aus Untereinheiten aus, die nach der 2TM/P- Struktur aufgebaut sind. Im Vergleich mit klassischen K⁺-Kanälen verfügt K_{cv} über einen auffällig kurzen N-Terminus und über keinen cytoplasmatischen C-Terminus (Plugge *et al.*, 2000). Das funktionelle Protein zeigt bei heterologer Expression in *Xenopus* Oozyten, HEK293-Zellen und auch in Hefen eine K⁺-selektive Leitfähigkeit (Plugge *et al.*, 2000; Moroni *et al.*, 2002; Balss *et al.*, 2008).

K_{cv} wird also, im Gegensatz zu K_{esv}, nach einer heterologen Expression höchstwahrscheinlich cotranslational über den sekretorischen Weg an die Plasmamembran transportiert.

Eine Chimäre, bei der die zweite TM von K_{cv} durch die von K_{esv} ausgetauscht wurde, wird widererwarten weiterhin über den sekretorischen Weg an die Plasmamembran gebracht. Im Gegensatz dazu verbleibt eine Chimäre, bei der die zweite TM von K_{esv} durch die von K_{cv} ausgetauscht wurde, im Cytosol und wird trotz verbleibender MTS am N-Terminus nicht in die Mitochondrien sortiert. Diese von Balss (2007) durchgeführten Lokalisationsstudien unterstreichen den lokalisationsentscheidenden Einfluss der ersten TM von K_{cv} und die Instabilität der Sortierung von K_{esv}.

Durch weitere Studien an K_{cv}-K_{esv}-Chimären konnte Chappuis (2013) einen weiteren sortierungsbestimmenden Sequenzbereich von K_{cv} in der ersten TM auf die Aminosäuren M26 - D68 eingrenzen. Die Insertion dieser Sequenz an gleicher Position in K_{esv} führt zu einer Sortierung in den sekretorischen Weg dieser Chimäre. Dies bekräftigt wiederum die fehlende Robustheit der Sortierungssignale, die K_{esv} für einen Transport in die Mitochondrien vorsehen.

1.5. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Sortierung von K_{esv} und K_{cv} weiterführend zu erforschen, wobei das Hauptaugenmerk auf der Untersuchung des Einflusses der Translationsgeschwindigkeit bzw. der Codonauswahl auf die Sortierung der beiden Kanäle lag.

Hierfür sollte zunächst der Ansatz einer quantitativen Lokalisationsuntersuchung etabliert werden, um nicht nur erfolgreiche Sortierungsereignisse abzubilden, sondern vielmehr ein repräsentatives Bild der Kanalsortierung über die Gesamtheit der betrachteten Zellen hinweg zu erschaffen.

Im Fall von Kesv wurden drei codon-veränderte Kesv-Varianten geschaffen, die in HEK292-Zellen mikroskopisch charakterisiert werden sollten: Kesv_{opt}, Kesv_{deopt} und Kesv_{random}. Am Beispiel von Kesv_{opt} wurden im Vergleich mit Kesv unterschiedliche Faktoren untersucht, die potenziell durch die Codonoptimierung beeinflusst sein könnten. So wurden folgende Faktoren vergleichend näher untersucht:

- A: Einfluss von Codonoptimierung auf die Expressionsgeschwindigkeit
- B: Einfluss von Codonoptimierung auf Transfektionseffizienz
- C: Einfluss von Codonoptimierung auf die Funktionalität von Kesv in den Mitochondrien
- D: Effizienz der Sortierung von Kesv_{opt}::eGFP als Funktion der Wachstumstemperatur
- E: Einfluss der Codonoptimierung auf die Proteinsortierung von Kesv in unterschiedlichen Zelltypen

Weiter war es ein Ziel, zu untersuchen, ob eine abschnittsweise Optimierung bzw. Deoptimierung von Kesv Einfluss auf die vorrangig mitochondriale Sortierung von Kesv hat. Aufgrund der starken Varianz der hierbei erhobenen Daten, sollten folgende Versuchsansätze Aufschluss auf den individuellen Zustand der Zelle und den Einfluss des jeweils betrachteten Faktors auf das Sortierungsschicksal von Kesv geben. Folgende Untersuchungen wurden angestellt:

- A: Untersuchung der Populationsverteilung von Kesv₁ auf dem Coverslip
- B: Untersuchung des Einflusses des metabolischen Status der Zelle auf die Sortierung von Kesv₁
- C: Untersuchung des Einflusses der Zellzyklusphase auf die Sortierung von Kesv₁
- D: Gibt die Mutterzelle ihre Sortierungsweise von Kesv₄ an die Tochterzelle weiter?

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, auch für Kcv eine grundlegende quantitative Lokalisationsstudie anzufertigen und auch hier durch ein codonoptimiertes Konstrukt (Kcv_{opt}) den potenziellen Einfluss der gezielten Codonauswahl auf die Sortierung von Kcv zu untersuchen. Zudem sollte in diesem Zusammenhang auch der Einfluss der *codon usage* auf die Sortierung der Kcv-Kesv-Chimären, die in der von Chappuis (2013) angefertigten Arbeit eine zentrale Rolle gespielt haben, tiefer untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Medien und Lösungen

2.1.1. Medien

Tabelle 1: Medienzusammensetzung

HEK293-Standardmedium	DMEM/F12 (1:1) Medium
COS-7-Medium	10 % FCS
HeLa-Medium	1 % Penicillin/Streptomycin
A549-Medium	DMEM/F12 (1:1) Medium
	10 % FCS
	1 % Penicillin/Streptomycin
	1 % (v/v) NEAA (<i>non-essential amino acids</i>)
HaCaT-Medium	DMEM Medium
	4,5 g/l Glukose
	2 mM Glutamin
	10 % FCS
	1 % Penicillin/Streptomycin
CO ₂ gepuffertes HEK293-Medium	Leibovitz' s (1 x) L-15 Medium
	10 % FCS
	1 % Penicillin/Streptomycin
High Glukose (4,5 g/L) HEK293-Medium	DMEM Medium
	10 % FCS
	1 % Penicillin/Streptomycin
Low Glukose (1 g/L) HEK293-Medium	DMEM Medium
	10 % FCS
	1% Penicillin/Streptomycin

Super Optimal Broth (SOC) -Medium	20 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 8,5 mM Natriumchlorid(NaCl) 2,5 mM Kaliumchlorid(KCl) 0,1 M Magnesiumchlorid(MgCl ₂) 20 mM Glukose
➔ Der pH-Wert (7,5) wurde mit 1 M NaOH eingestellt und nachfolgend autoklaviert	
Luria-Bertani (LB) -Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl
➔ Der pH-Wert (7,0) wurde mit 1 M NaOH eingestellt und, um ein selektives Medium zu erhalten, wurden 100 µg/ml Kanamycin hinzugegeben. Zur Herstellung der Festmedien wurden 20 g/l Agarose hinzugegeben	

2.1.2. Lösungen

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Phosphate buffered saline solution (PBS)	8 g/l Natriumchlorid(NaCl) 0,2 g/l Kaliumchlorid(KCl) 1,42 g/l Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) 0,24 g/l Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)
➔ Der pH-Wert (7,4) wurde mit 1 M NaOH eingestellt und anschließend autoklaviert	
1 x Tris-Acetat-EDTA (1 x TAE) -Puffer	1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 40 mM Tris 20 mM Eisessig
➔ Der pH-Wert (8,0) wurde mit HCl eingestellt	
PI-Färbelösung	10 ml 0,1 % Triton in PBS 2 mg RNase A 200 µl 1mg/ml Propidium Iodid
5 x Lämmli-puffer-Stock	15 ml 2 M Tris 10 g SDS 57,5 ml Glycerin

5 x Lämmli-pufferlösung	7,5 ml 5 x Lämmli-puffer-Stock 2,5 ml β -Mercaptoethanol 0,3 g Bromphenolblau
10 x Lysepuffer	100 mM NaCl 100 mM Tris (pH 8) 30 mM $MgCl_2$ 5 % NP-40
1 x Lysepuffer	1 ml 10 x Lysepuffer 0,1 mM PMSF 100 μ l DLAC (1:1000 in DMSO) 10 μ l DNase 1 (10 mg/ml) 9 ml ddH ₂ O
1 x Blotpuffer	7,2 g/l Glycin 1,5 g/l Tris
10 x TBS	90 g/l 9 % NaCl 13,44 g/l Tris
➔ Der pH-Wert (7,4) wurde mit HCl eingestellt	
TBS-T	1 l 1 x TBS 500 μ l Triton X100

2.2. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland), Bio-Rad GmbH (München, Deutschland), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Invitrogen AG (Karlsruhe, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), GE Healthcare (Freiburg, Deutschland), Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland), Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Deutschland), bezogen.

2.3. Zelllinien

HEK293-Zellen:

Bei HEK293-Zellen handelt es sich um adhärent wachsende humane embryonale Nierenzellen (*Human Embryonic Kidney* –HEK), die durch Transformation mit einem Adenovirus immortalisiert wurden (Graham *et al.*, 1977). Sie wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in DMEM/F12-Medium mit stabilem Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), das mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep versetzt ist, kultiviert und alle 3 - 4 Tage durch dieselbe Person passagiert.

A549-Zellen:

Bei A549-Zellen (*adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells*) handelt es sich um eine humane Zelllinie, die 1972 einem Lungentumor entnommen wurden (Giard *et al.*, 1973). Sie wachsen adhärent und einschichtig. Sie wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in DMEM/F12-Medium mit stabilem Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), das mit 10 % FCS , 1 % Pen/Strep und 1 % NEAAs versetzt ist, kultiviert und alle 3 - 4 Tage von derselben Person passagiert.

COS-7-Zellen:

COS-7-Zellen sind tierische, adhärent wachsende, fibroblastenähnliche Zellen, die einem afrikanischen Grünaffen entstammen (Gluzman, 1981). Sie wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in DMEM/F12-Medium mit stabilem Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), das mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep versetzt ist, kultiviert und alle 3 - 4 Tage durch dieselbe Person passagiert.

HaCaT-Zellen:

HaCaT-Zellen sind humane Keratinocyten, die *in vitro* spontan transformiert wurden und ursprünglich aus histologisch normaler adulter Haut stammen (Boukamp *et al.*, 1988). Ihren Namen verdanken sie ihrem Ursprung und den initialen Wachstumsbedingungen, bei denen adulte humane Haut Keratinocyten unter niedrigen Ca²⁺-Konditionen und erhöhter Temperatur (38,5 °C) gewachsen sind (Boukamp *et al.*, 1988). Sie wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in DMEM-Medium das mit 4,5 g/l Glukose, mit 2 mM stabilem Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep versetzt ist, kultiviert und alle 3 - 4 Tage durch dieselbe Person passagiert

HeLa-Zellen:

Bei HeLa-Zellen handelt es sich um die erste humane Zelllinie, die 1951 einem Cervixkarzinom einer 31-jährigen Frau entnommen wurden (Scherer *et al.*, 1953). Die adhärent wachsenden Epithelzellen sind mit dem Papilloma Virus Typ 18 (HPV-18) infiziert und aneuploid (Scherer *et al.*, 1953). Sie wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in DMEM/F12-Medium mit stabilem Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), das mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep versetzt ist, kultiviert und alle 3 - 4 Tage durch dieselbe Person passagiert.

2.4. Codonveränderte DNA-Varianten der Konstrukte

Alle codonoptimierten und -deoptimierten Varianten der DNA von Kesv und Kcv wurden über die GeneArt® Gene Synthesis von ThermoFisher Scientific™ (Waltham, MA, USA) bezogen. Die DNA-Sequenz von Kesv_{random} wurde durch ein Matlab-Skript von Oliver Rauh erstellt, das eine nicht gerichtete Auswahl an Codonen anhand ihres CAI zur Folge hatte. Die Synthese der DNA-Sequenz und die Klonierung in den pEGFP-N2-Vektor fand im Falle von Kesv_{random} auch durch ThermoFisher Scientific™ (Waltham, MA, USA) statt.

2.5. Mutagenese

Zur Erstellung der Kanalchimären wurde entweder eine Chimären-PCR durchgeführt (Heckman & Pease, 2007) oder, wenn die Änderungen nur einzelne Punktmutationen bedeuteten, wurde eine *site-directed mutagenesis* (SDM) *polymerase chain reaction* (PCR) gewählt.

Für Chimären, bei denen ganze DNA-Sequenzabschnitte ausgetauscht wurden, wurden zunächst zwei oder drei gewünschte Genfragmente von den entsprechenden DNA *templates* amplifiziert. Um in einer weiteren PCR die Fusion der amplifizierten Genfragmente zu gewährleisten, wurden über die Primer Überhänge geschaffen, die komplementär zu dem benachbarten Genfragment sind. Über die Überhänge der äußersten Fragmente wurden Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingebracht, um im späteren Verlauf eine Ligation mit dem Vektor zu ermöglichen. Für alle beschriebenen PCR-Ansätze wurde die Phusion-DNA-Polymerase (ThermoFisher Scientific™; Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Alle PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 1 - 2 %-Agarose-Gel in 1 x TAE aufgetrennt, über das Zymoclean™ Gel DNA recovery Kit (Zymo Research; Irvine, CA, USA) den Herstellerangaben folgend aufgereinigt und ihre DNA-Konzentration mithilfe des Nano-Drop® ND-1000 Spektrometer (peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen, Deutschland) photometrisch bestimmt.

Nach Fusion aller gewünschten Genfragmente mittels PCR und wiederholter Aufreinigung wurde sowohl der leere pEGFP-N2 als auch das finale PCR-Produkt mit den entsprechenden *Fast Digest*® Restriktionsenzymen (ThermoFisher Scientific™; Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben

behandelt und im nächsten Schritt das PCR-Produkt mittels T4-Ligase (ThermoFisher Scientific™; Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben in den geschnittenen Vektor ligiert. Für die Transformation von hitzekompetenten *E.coli*-Zellen wurde der volle Ligationsansatz verwendet. Hierfür wurden zunächst 50 μL der *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, anschließend der gesamte Ligationsansatz hinzugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Transformation der *E.coli*-Zellen erfolgt durch einen Hitzeschock bei 42 °C für eine Minute und weitere zwei Minuten Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 250 μL SOC-Medium hinzugegeben und die Zellen bei 37 °C für 1 h im Schüttler inkubiert. Zuletzt wurde der Transformationsansatz auf LB-Kanamycin-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Daraufhin wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, um die gepickten und in 10 μl ddH₂O aufgelösten Kolonien auf das gewünschte Insert hin zu überprüfen. Der *forward* Primer wurde hierbei so gewählt, dass er vor dem Insert im Vektor bindet und der *reverse* Primer entsprach dem der letzten PCR.

Mit den positiven Kolonien wurden wiederum LB-Medium Flüssigkulturen angeimpft, die mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin versetzt sind. Am Folgetag wurde die Plasmid-DNA mittels *ZR Plasmid Miniprep™-Classic Kit* (Zymo Research; Irvine, CA, USA) aufgereinigt und durch das Unternehmen Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Die Sequenzierung wurde unter Verwendung der Software *SnapGene* (GSL Biotech; Chicago, IL, USA) kontrolliert.

Chimären, die über eine SDM entstanden sind, wurden nach der *QuickChange™*-Methode (Papworth *et al.*, 1996) hergestellt. Hierfür wurden reverskomplementäre Primer erstellt, die die gewünschte Mutation enthalten; das komplette Plasmid wurde dann unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase (ThermoFisher Scientific™; Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in einem 1 %-Agarose Gel in 1 x TAE elektrophoretisch aufgetrennt, mittels *Zymoclean™ Gel DNA recovery Kit* (Zymo Research; Irvine, CA, USA) aufgereinigt und im Anschluss die *template* DNA mittels Restriktionsverdau mit *FastDigest® Dpn1* (ThermoFisher Scientific™; Waltham, MA, USA) abgebaut. Darauf folgte, wie bereits beschrieben, die Transformation von *E. coli*-DH5 α -Zellen über einen Hitzeschock, wobei im Falle der SDM lediglich 5 μl des Ansatzes hinzugegeben wurden. Positive Kolonien wurden gepickt und Flüssigkulturen mit Kanamycin als Selektionsmarker angeimpft. Die Plasmid-DNA wurde mittels *ZR Plasmid Miniprep™-Classic Kit* (Zymo Research; Irvine, CA, USA) aufgereinigt und durch das Unternehmen Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Die Sequenzierung wurde auch hier unter Verwendung der Software *SnapGene* (GSL Biotech; Chicago, IL, USA) kontrolliert.

2.6. Heterologe Expression

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Lokalisationsstudien standardmäßig mit *human embryonic kidney* (HEK)-293-Zellen durchgeführt. Jedoch wurden auch die unter 2.3 gelisteten Zelllinien entsprechend gleich behandelt. Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in T25-Zellkulturflaschen im Brutschrank mit den entsprechenden unter 2.1.1 beschriebenen Nährmedien kultiviert.

Für die Aufnahmen wurden die Zellen 48 h vor Begutachtung auf Glas *coverslips* (No. 1.0; Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Deutschland) mit einem Ø=25 mm ausgesät. Die *coverslips* wurden zuvor mit purem Alkohol steril abgeflammt. Die Zellen wurden für ca. 24 h bei 37 °C mit 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Sobald sie eine Konfluenz von 60 % erreicht hatten, wurden sie mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde GeneJuice® (Novagen, EMD Millipore Corp.; Billerica, MA, USA) oder TurboFect™ (Life Technologies GmbH; Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurde immer 1 µg Plasmid-DNA des entsprechenden Konstrukts verwendet oder, im Falle einer Co-Transfektion, mit jeweils 0,5 µg der gewünschten Konstrukte.

Bei Versuchen zur Temperaturabhängigkeit wurde 4 h nach Transfektion ein Medienwechsel mit Leibovitz (1 x) L-15-Medium durchgeführt und die Zellen über Nacht bei der entsprechenden Temperatur frei von CO₂ inkubiert. Bei jedem Versuch zur Temperaturabhängigkeit wurde unter gleicher Behandlung eine Kontrolle bei 37 °C mitgeführt.

Bei Versuchen zum Einfluss des metabolischen Status auf die Proteinsortierung wurde 4 h nach Transfektion ein Medienwechsel zum entsprechenden unter 2.1.1 gelisteten Medium durchgeführt und die Zellen über Nacht bei 37 °C mit 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Bei jedem Versuch zum Einfluss des metabolischen Status auf die Proteinsortierung wurde unter gleicher Behandlung eine Kontrolle im HEK293-Standardmedium mitgeführt.

HEK293-Zellen, die im weiteren Verlauf für den Westernblot verwendet wurden, wurden nicht auf *coverslips* ausgesät, jedoch in allen Folgeschritten bis zur Vorbereitung zum Zellaufschluss gleich behandelt wie für Lokalisationsstudien vorgesehene HEK293-Zellen.

2.7. Fluoreszenz Mikroskopie – CLSM

Die mikroskopische Primäruntersuchung der Proteinsortierung in HEK293-Zellen und den unter 2.3 gelisteten Zelllinien wurde an einem konfokalen Leica TCS SP5 II Mikroskop (Leica GmbH, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die mikroskopischen Aufnahmen, die vorrangig für statistische Auszählungen dienten, wurden an einem konfokalen Leica TCS SP Mikroskop (Leica GmbH, Heidelberg, Deutschland) erstellt. Zur Aufnahme wurden die auf *coverslips* ausgesäten Zellen, wenn nicht anders beschrieben, mindestens 18 h nach Transfektion in selbstgebaute Aluschälchen eingespannt und mit

500 μ l PBS überschichtet. Wurden zwei Fluoreszenzsignale aufgenommen, geschah dies über sequenzielle Aufnahmen mit der Einstellung „*between lines*“. Grundsätzlich wurde ein *frame average* von 6 - 10 Wiederholungen gewählt. In allen Fällen war das *pinhole* auf 1 *airy disc* eingestellt und als Objektiv wurde entweder das PL APO 100,0x1,40 OIL UV oder das HCX PL APO 63,0x1,20 W CORR UV gewählt. Für die Anregung des eGFP ($Ex_{max}/Em_{max} = 488/509$) wurde ein Argon Laser (488 nm) verwendet; die Emission wurde zwischen 505 und 535 nm detektiert.

Die Anregung von mCherry ($Ex_{max}/Em_{max} = 587/610$) geschah durch einen Krypton Laser (568 nm); die Emission wurde zwischen 590 und 700 nm detektiert.

Die Primärbetrachtung geschah immer ohne die Koexpression eines Markerproteins, um einen möglichen Einfluss durch die Überexpression eines Kompartiment-spezifischen Proteins auszuschließen. Für die Markierung der inneren mitochondrialen Membran wurde die VIII. Untereinheit der humanen Cytochrom C Oxidase (COXVIII) mit dem Fluoreszenzprotein mCherry fusioniert (COXVIII::mCherry). Für die Markierung des ERs wurde das sich im Lumen des ERs befindliche Calreticulin (CALR) mit mCherry fusioniert und zusätzlich die ER-Reternierungssequenz KDEL an das Ende des mCherrys kloniert. Das so entstandene ER-Markerprotein wird in dieser Arbeit als KDEL::mCherry bezeichnet. Beide Plasmide wurden über Addgene (Cambridge, MA, USA) bezogen; mCherry-Mito-7 und mCherry-ER-3 wurden freundlicherweise von Michael Davidson (Addgene plasmids #55102 und #55041) zur Verfügung gestellt.

Für die statistischen Untersuchungen der anteiligen Lokalisationen der verschiedenen Konstrukte wurden, wenn nicht anders beschrieben, Übersichtsaufnahmen gemacht, bis mindestens 100 Zellen aufgenommen wurden. Die Klassifizierung der Sortierung fand entweder simultan mit der Aufnahme statt oder wurde im Anschluss unter Benutzung der LAS AF Lite Software (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt.

Die Datenauswertung erfolgte ansonsten mittels des Programms FIJI (Schindelin *et al.*, 2012). Zur Feststellung des Pearson Korrelationskoeffizienten (PCC) wurde jeweils ein quadratischer Bereich ausgewählt und eine *region of interest* (ROI) erstellt. Über das Plugin *PCS Colocalisation* wurde der PCC bestimmt. Der *threshold* (Schwelle) wurde durchgängig bei 40 gewählt. Der Verlauf der Grauwerte wurde über eine zuvor gezogene Linie mit dem Befehl *Analyse>Plot Profile* durchgeführt.

Abbildungen wurden entweder mit IGOR Pro 6 (Wavemetrics, Tigard, OR, USA) oder Origin 9 (OriginLab, Northampton, MA, USA) erstellt.

2.8. Durchflusszytometrie

2.8.1. Mitochondriales Membranpotential

Das mitochondriale Membranpotential kann im Vergleich zu einer Kontrolle mittels Mitochondrien selektiver Färbung gemessen werden (Scaduto & Grotyohann, 1999). Tetramethylrhodamin-methylester (TMRM; $E_{x_{max}}/E_{m_{max}}=548/574$ nm) ist ein Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoff, der aufgrund seiner positiven Ladung in gesunden Mitochondrien akkumuliert. Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zum mitochondrialen Membranpotential (MMP). Die Zellen wurden >18 h nach Transfektion mit dem entsprechenden Konstrukt vermessen. Hierfür wurde zunächst das Zellmedium abgenommen und die Zellen mit 10 nM TMRM in 1 ml PBS überschichtet und für 30 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin mittels Accutase geerntet, mit PBS gewaschen und bei 700 g für 5 min bei RT pelletiert. Das Zellpellet wurde in 300 μ l PBS resuspendiert und mit einem 40 μ m Filter gefiltert. Die Fluoreszenz wurde im *S3e Cell Sorter* (Bio-Rad GmbH; München, Deutschland) vermessen. Je >10.000 Zellen pro Probe wurden mittels Anregung durch den 488 nm Laser und Detektion der Fluoreszenz im FL2-Kanal analysiert. Als positive Kontrolle für die Reduktion des MMP dienten HEK293-Zellen, die mit dem Entkoppler Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) behandelt wurden. Hierfür wurden sie zusätzlich für 5 min mit 5 μ l (bei 1 ml Medium) einer Lösung von 20 mM CCCP in DMSO bei RT inkubiert und ansonsten wie die anderen Proben behandelt. Als weitere Kontrollen wurden zudem auch noch untransfizierte und ungefärbte Proben vermessen. Die Daten wurden mit der *FlowJo* (FlowJo, LLC; Ashland, OR, USA) Software analysiert und das FL2-Flächen log gegen den *Signal-count* der detektierten Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollmessungen aufgetragen.

2.8.2. Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse wurde an mit Kesv::eGFP und Kesv_{opt}::eGFP (Bzw. Kesv und Kesv_{opt} ohne eGFP-tag) transfizierten, fixierten HEK293-Zellen mittels Propidium Iodid-Färbung durchgeführt. Die Zellen wurden >18 h nach Transfektion mittels Trypsin-Reaktion geerntet, in 5 ml PBS überführt und für 6 min bei Raumtemperatur (RT) mit 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 0,5 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden in 4,5 ml 70 % Ethanol bei -20 °C und unter stetigen vortexen fixiert. Die fixierten Zellen wurden 5 min mit 1000 rpm bei RT zentrifugiert, in 5 ml PBS resuspendiert und wiederum 5 min bei 1000 rpm und RT pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml 1 x PI Färbelösung resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden vor der Messung erneut pelletiert, in 0,5 ml PBS aufgenommen und durch einen 40 μ m Filter gefiltert. Die Messungen wurden mittels des blauen Lasers (488 nm) des *S3e Cell Sorter* (Bio-Rad GmbH; München, Deutschland) durchgeführt.

Die Zellzyklusphasen wurden mit der *FlowJo* (FlowJo, LLC; Ashland, OR, USA) Software durch die Analyse der PI-Höhen- zu PI-Flächen-Verteilung ermittelt.

2.9. Westernblot

Um zu untersuchen, ob die Hintergrundfluoreszenz von Kesv und Kesv_{deopt} in der Tat auf Abbauprodukte des Fusionsproteins zurückzuführen ist, wurde das Ganzzell-Lysat von Kesv::eGFP, Kesv_{opt}::eGFP, Kesv_{deopt}::eGFP und freies eGFP exprimierenden HEK293-Zellen mittels Westernblot analysiert. Hierfür wurden die Zellzahlen >18 h nach Transfektion mit dem *Eve™ Automated Cell Counter* (NanoEnTek USA Inc.; Waltham, MA, USA) ermittelt. Die Zellen wurden bei 1000 g pelletiert und darauffolgend mit so viel 10 x Lysepuffer gelöst dass zusammen mit dem später hinzugefügten 5 x Lämmli-puffer eine gewünschte Zellzahl von 10.000 Zellen / μ l erreicht wurde. Mit Lysepuffer versetzt wurden die Zellen für 15 min bei 37 °C ruhend inkubiert. Die Suspension wurde mit dem entsprechenden Volumen 5 x Lämmli-puffer versetzt und für 10 min bei 56 °C inkubiert. Die Proben wurden durch ein 17,5 % SDS-Gel bei konstanten 4 mA über Nacht aufgetrennt. Der Protein-Transfer auf eine 0,45 μ m PVDF (Polyvinylidenfluorid) -Membran fand als *wet-electrophoretic-transfer* 3 h bei 400 mA in 1 x Blot-puffer statt. Die Immunofluoreszenzfärbung fand statt, nachdem die Membran für 1 h (oder ÜN bei 4 °C) in 2 % Milchpulverlösung abgeblockt und im Anschluss einmal für 5 min mit TBS, zweimal 5 min mit TBS-T-Lösung und darauf noch einmal für 5 min mit TBS gewaschen wurde.

Der Primärantikörper, der zur Detektion von eGFP genutzt wurde, war ein α -GFP Antikörper (AK), der aus Hasen gewonnen wurde; als Sekundärantikörper diente hier ein α -rabbit Cy5 konjugierter AK. Die Membran wurde für 1 h mit dem 1:1000 in 2 % Milchpulverlösung verdünnten Primärantikörper bei RT schwenkend inkubiert und im Anschluss, wie bereits beschrieben, mit TBS- und TBS-T-Lösung gewaschen. Daraufhin wurde die Membran mit dem 1:1000 in 2 % Milchpulverlösung verdünnten Sekundärantikörper für 1 h im Dunkeln schwenkend inkubiert und wiederum wie bereits beschrieben gewaschen.

Die Membran wurde getrocknet und im Anschluss die Cy5 Fluoreszenz ($E_{\text{max}}/E_{\text{max}}=650/667$ nm) nach Anregung mit dem 633 nm Laser des *Typhoon Imagers* (GE Healthcare GmbH, Freiburg, Deutschland) detektiert.

Zur Detektion des *housekeeping* genes β -Aktin wurde die Chemilumineszenz eines *Horseradish-Peroxidase* (HR) konjugierten Sekundärantikörpers genutzt. Hierfür wurde die Membran wie bereits beschrieben mit TBS- und TBS-T-Lösung gewaschen und für 1 h mit einem 1:1000 in 2 % Milchpulverlösung verdünnten α - β -Aktin-Antikörper schwenkend inkubiert. Daraufhin wurde die Membran erneut wie beschrieben mit TBS und TBS-T gewaschen, um dann für 1 h mit einem α -HR-Peroxidase Sekundärantikörper schwenkend inkubiert zu werden. Nach wiederholter Waschung mit TBS und TBS-T wurde die Chemilumineszenz mittels *SuperSignal™ West Pico Plus Chemiluminescent Substrate Kit*

(ThermoFisher Scientific™; Waltham, MA, USA) im *Fusion SL imaging system* (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland) detektiert. Alle benannten Antikörper wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Richard Zimmermann (UKS, Homburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

2.10. Statistische Analyse

Die Signifikanz wurde über einen Zweistichproben-t-Test überprüft. Ein p-Wert $< 0,05$ (*) wurde als signifikant erachtet, ein p-Wert $\leq 0,01$ als ** gekennzeichnet und eine hohe Signifikanz wurde als p-Wert $\leq 0,001$ definiert und mit *** gekennzeichnet.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Kescv

3.1.1. Vorangegangene Studien

Das Genom des EsV-1 wurde im Zuge eines Genomprojekts vollständig sequenziert und so unter anderem das Genprodukt EsV-1 Kescv identifiziert (Van Etten *et al.*, 2002). Dieses wird aufgrund von Strukturvorhersagen und dem Vorhandensein eines GYG-Motivs als putativer Kaliumkanal eingeschätzt. Bis dato konnte jedoch in verschiedenen Expressionssystemen keine reproduzierbare Kaliumleitfähigkeit beobachtet werden, die von Kescv induziert wurde. Im Vergleich zum bereits elektrophysiologisch charakterisierten Kaliumkanal Kcv::GFP zeigt Kescv::GFP jedoch eine völlig abweichende zelluläre Sortierung in HEK293-Zellen (Mehmel, 2004) weswegen das Sortierungsverhalten von Kescv::GFP näher untersucht wurde. Mehmel (2004) beschrieb zunächst die Lokalisation von Kescv::GFP als punktförmige Strukturen. Über Lokalisationsuntersuchungen mittels CLSM und Kolokalisationsstudien mit MitoTracker™ Red konnte Balss (2008) diese Strukturen als Mitochondrien identifizieren und ausschließen, dass Kescv::GFP im heterologen Expressionssystem als fehlgefaltetes Protein in den Lysosomen abgebaut wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass Kescv::GFP weder über das ER, noch über den Golgi-Apparat in die Mitochondrien transportiert wird. Chappuis (2013) hat im weiteren Fortgang unter anderem untersucht, wie die qualitative und quantitative Analyse der Kolokalisation von Kescv::eGFP verbessert werden kann. In Kolokalisationsstudien zwischen Kescv::eGFP und dem ER Marker ERTracker™ Red zeigte sich wider Erwarten eine falsch positive Kolokalisation, da ERTracker™ Red teilweise Mitochondrien unspezifisch markiert. Um dieses Problem zu beheben, wurden weitere Untersuchungen mittels eines ER-spezifischen Markerproteins (KDEL::mKate2) durchgeführt.

Bei KDEL handelt es sich um eine bekannte ER-Retentions-Sequenz (Munro und Pelham, 1987), die mit dem rot fluoreszierenden Protein mKate2 fusioniert wurde, um eine klare Kolokalisation mit dem ER zu ermöglichen. Für Kolokalisationsstudien mit Mitochondrien-assoziierten Proteinen wurde das COXVIII Protein, das eine Untereinheit der CytochromC Oxydase ist (Rizzutto *et al.*, 1989), mit mKate2 fusioniert, um somit die Markierung der inneren mitochondrialen Membran zu erlauben.

3.1.2. Statistische Analyse der prozentualen Lokalisation von Kescv::eGFP

In den beschriebenen Studien wurde die Sortierung von Kescv::eGFP aufgrund von positiver Lokalisation diskutiert. Es wurde gezielt nach Zellen gesucht, in denen Kescv::eGFP einem Zellkompartiment zugeschrieben werden kann. Um eine aussagekräftige Gesamtübersicht zu gewinnen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Lokalisationsstudien von Balss (2008) und Chappuis (2013) an Kescv::eGFP in

HEK293-Zellen wiederholt, hier jedoch das Augenmerk auf die quantitative Verteilung der unterschiedlichen Lokalisationen von Kev::eGFP gelegt.

Um die Problematik der, durch Chappuis (2013) beschriebenen falsch positiven Korrelation der Tracker-Signale und des Kev::eGFP-Signals zu umgehen, wurde entweder das Markerprotein KDEL::mCherry, für ER-assoziierte Proteine, oder das Markerprotein COXVIII::mCherry, für Mitochondrien-assoziierte Proteine (Rizzutto et al. 1989), verwendet. Die jeweiligen Markerproteine, wurden hier allerdings für eine bessere Auflösung der Fluoreszenzsignale mit dem rot fluoreszierenden Protein mCherry fusioniert, welches in seinen Eigenschaften mKate2 ähnelt. Die primäre Betrachtung der Proteinsortierung in Zellen fand jedoch stets ohne Koexpression von Markerproteinen statt, um eine möglichen Verfälschung der Sortierungsverhältnisse durch die Überexpression der Markerproteine zu verhindern.

Um die Sortierungsverhältnisse zu bestimmen, wurden in jedem Fall >100 Zellen an verschiedenen Tagen betrachtet und anschließend den Kategorien mitochondrial sortiert (Mito), ER sortiert (ER) und unsortiert (US) zugeordnet (**Abbildung 3.1.1**). Als mitochondrial sortiert wurden Zellen kategorisiert, die trotz möglicherweise hoher Hintergrundfluoreszenz, deutliche punktuelle und tubuläre eGFP-Akkumulationen zeigten und, im Vergleich mit dem mitochondrialen Markerprotein COXVII::mCherry eine hohe Deckungsgleichheit aufwiesen.

Im Gegensatz dazu, wurden Zellen, die eine eher netzartige eGFP-Verteilung und zudem noch den ER-typischen perinukleären Ring aufwiesen, als ER-sortiert eingeordnet. Auch hier diente der Vergleich mit dem ER-ständigen Markerprotein KDEL::mCherry als Validierung der primären Einordnung.

Die Einordnung in die Kategorie „unsortiert“ ist hingegen weniger eindeutig. Diese Kategorie umschließt zur Vereinfachung alle eGFP-Verteilungen, die augenscheinlich nicht zweifelsfrei in die anderen Kategorien einzuordnen sind, jedoch auch keine Strukturen aufweisen, die auf eine gezielte Lokalisation in einem nicht kategorisierten Kompartiment hinweisen. Somit umfasst sie Zellen, die zum einen ein vollkommen flächiges eGFP-Signal haben, ohne (US_1) und mit (US_2) Aussparung des Zellkerns, zum anderen ein flächiges eGFP-Signal haben, das sowohl Mitochondrien als auch den perinukleären Ring ausspart (US_3) sowie Zellen, bei denen das eGFP-Signal flächig vorliegt aber auch in max. 3 punktuellen Strukturen akkumuliert (US_4) vorliegt. Der Grenzwert von maximal 3 erkennbaren punktuellen Strukturen wurde festgelegt, um eine Grenze zur Einordnung in die Kategorie „Mito“ zu setzen. Die Sekundärbetrachtung mit dem mitochondrialen Markerprotein hat gezeigt, dass HEK-Zellen in der Regel deutlich mehr Mitochondrien tragen (>40 in einer Betrachtungsebene) und somit 3 erkennbare Mitochondrien im Verhältnis zu den potenziell verfügbaren Mitochondrien in den meisten Fällen vernachlässigbar sind.

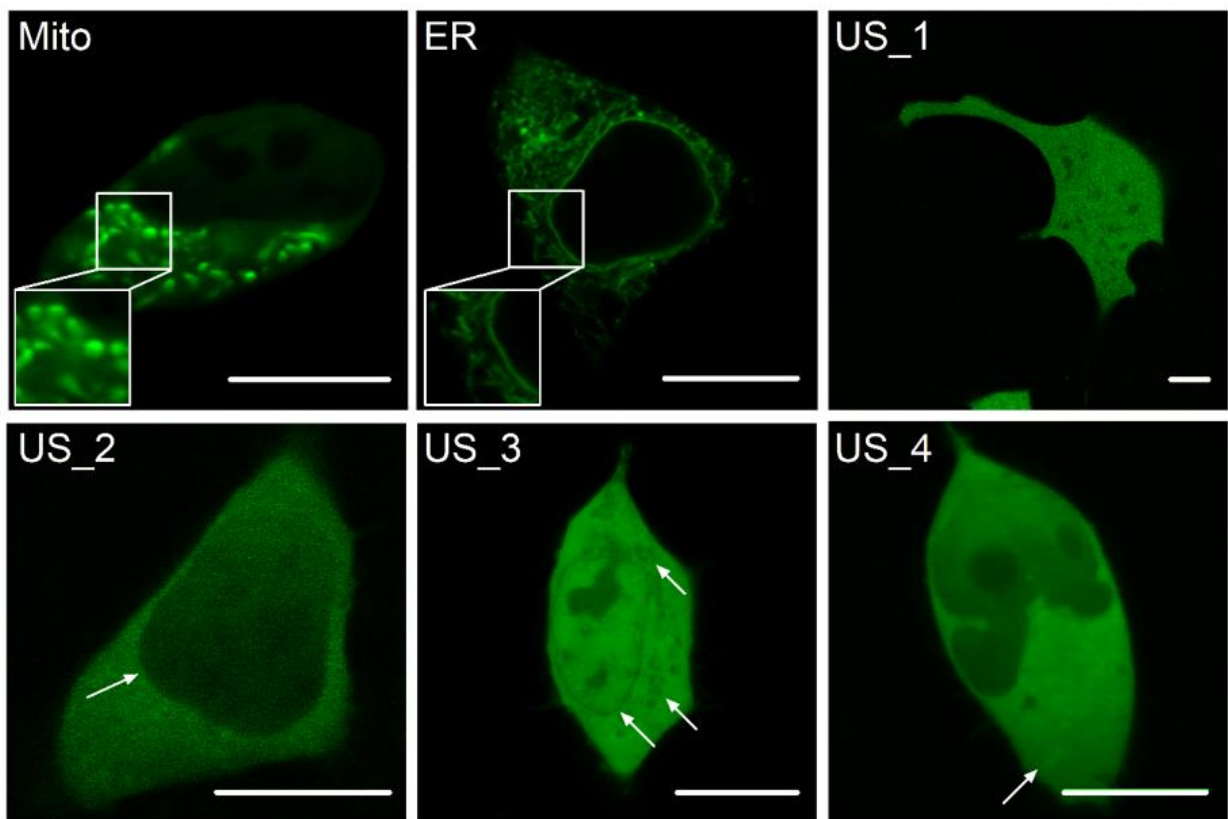


Abbildung 3.1.1: Kategorien der Sortierung

Beispielhafte Zellen der Kategorien mitochondrial sortiert (Mito), ER-sortiert (ER) und verschiedene Ausprägungen der als unsortiert (US) kategorisierten Zellen. Der Pfeil markiert bei US_2 den ausgesparten Zellkern, bei US_3 zum einen die Zellkernmembran und Mitochondrien und bei US_4 punktuelle Strukturen in denen das eGFP-Signal akkumuliert. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

Um die primäre Einordnung der Kategorien zu validieren, wurde der Versuch im Anschluss unter Verwendung der Markerproteine wiederholt und das Sortierungsverhältnis wie zuvor bestimmt.

Kesv::eGFP zeigte in beiden Fällen dieselbe Verteilung. Trotz seiner bereits von Chappuis (2013) beschriebenen hohen Hintergrundfluoreszenz wird der Hauptteil der Zellen als mitochondrial sortiert kategorisiert. **Abbildung 3.1.2 A** zeigt exemplarisch eine Zelle, die als mitochondrial sortiert eingeordnet wurde. Die in **Abbildung 3.1.2 D** gezeigte Zelle zeigt eine Kolo-kalisation mit KDEL::mCherry weswegen sie als ER-sortiert einzuordnen ist. Die exemplarische Zelle in **Abbildung 3.1.2 G** zeigt keine eindeutige Strukturierung auf, sondern zeichnet sich durch ein cytosolisch, gleichmäßig verteiltes eGFP-Signal aus und wurde daher als unsortiert kategorisiert. Auch bezüglich der Fälle in denen eine klare Sortierung von Kesv zu erkennen ist, ist an dieser Stelle anzumerken, dass in all diesen Fällen eine deutliche unspezifische Hintergrundfluoreszenz festzustellen ist.

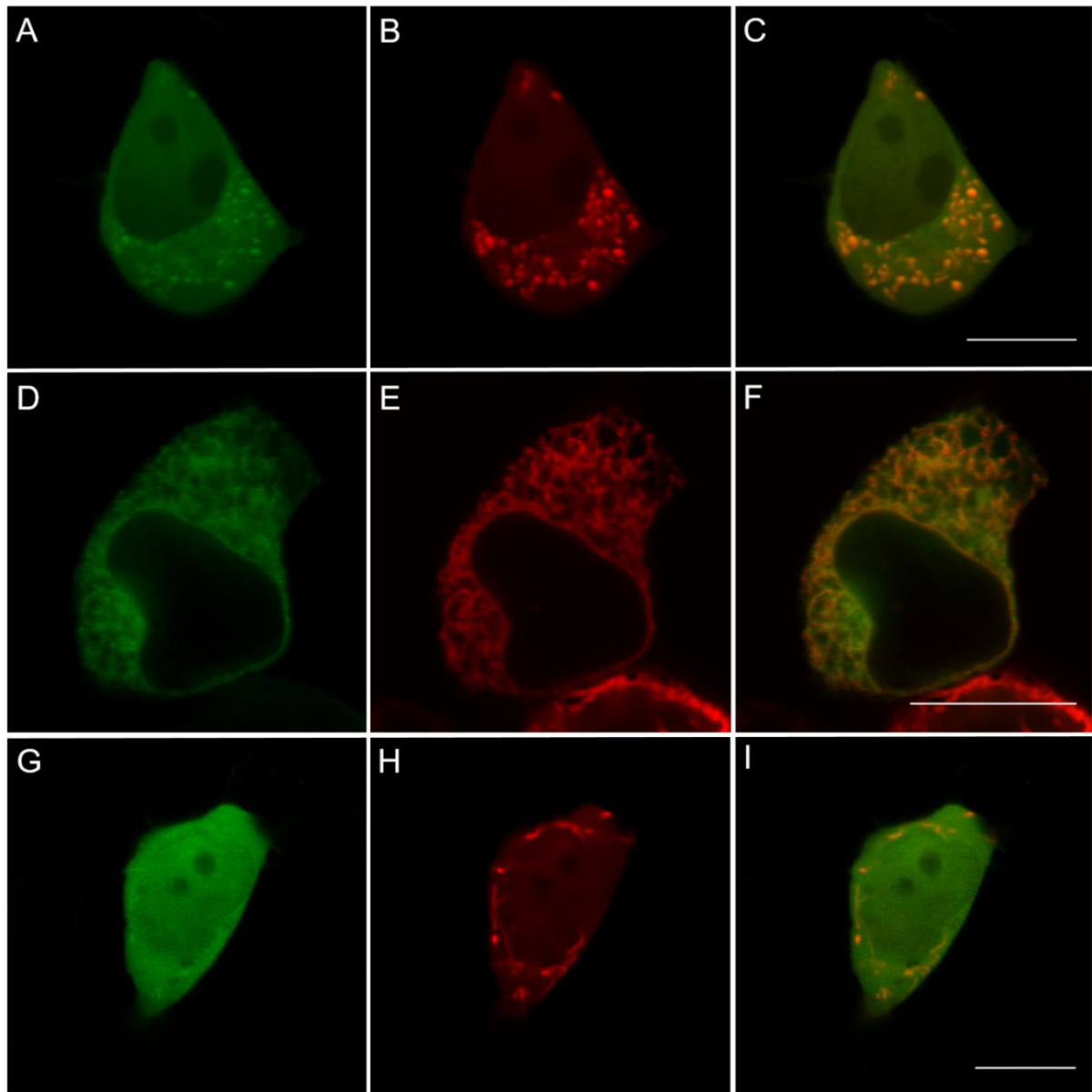


Abbildung 3.1.2: Lokalisation von Kesv::eGFP

CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit Kesv::eGFP und entweder mit COXVIII::mCherry oder KDEL::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt Kesv::eGFP mitochondrial und (G) unsortiert. (B) bzw. (H) zeigen die entsprechenden Zellen mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (C) bzw. (I) das *Overlay* beider Kanäle. (D) zeigt Kesv::eGFP ER sortiert, (E) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein KDEL::mCherry und (F) das *Overlay* beider Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

Die statistische Analyse von n=259 Kesv::eGFP exprimierenden HEK293-Zellen (N=7) zeigt, wie in **Abbildung 3.1.3** zu sehen, dass Kesv::eGFP nach den genannten Kriterien in 61 % der Fälle mitochondrial sortiert vorliegt, in 37 % der Fälle unsortiert und in 2 % ER-sortiert einzuordnen ist. Durch die quantitative mikroskopische Untersuchung konnte hier somit erstmalig auch eine - wenn auch seltene - Sortierung ins ER für Kesv beobachtet werden (Vergleich Chappuis, 2013).

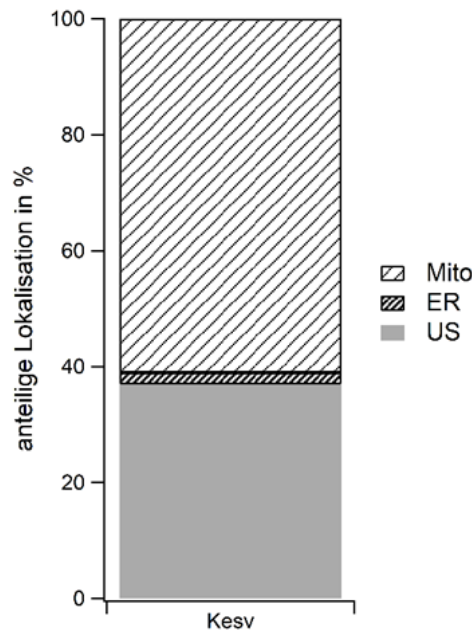


Abbildung 3.1.3: Prozentuale Verteilung von Ksv auf die Zellkompartimente

Aufgetragen ist die anteilige Lokalisation in Prozent von Ksv ($n=259$) im ER, in den Mitochondrien und im Cytosol von HEK293-Zellen.

Exemplarisch werden im Folgenden die statistischen Daten aus den ersten drei Betrachtungstagen ($N=3$) aufgetragen, um zu prüfen, ob eine dreifache Wiederholung der Betrachtung ausreicht oder überhaupt notwendig ist.

Folgende prozentuale Lokalisationsanteile konnten für mit Ksv::eGFP transfizierte HEK293-Zellen an drei verschiedenen Tagen erhoben werden (siehe **Abbildung 3.1.4**):

- Tag 1 ($n=63$): 82 % der betrachteten Zellen zeigen eine mitochondriale Sortierung, in 2 % der Zellen liegt Ksv::eGFP im ER lokalisiert vor und in 16 % der Zellen liegt das eGFP-Signal unsortiert vor.
- Tag 2 ($n=58$): Bei 57 % der betrachteten Zellen liegt Ksv::eGFP in den Mitochondrien lokalisiert vor, bei 2 % im ER und bei 41 % der Zellen ist keine klare Sortierung von Ksv auszumachen.
- Tag 3 ($n=53$): In 51 % der betrachteten Zellen liegt Ksv::eGFP in die Mitochondrien sortiert vor, bei 1 % der Zellen im ER und 48 % der Zellen werden als „unsortiert“ kategorisiert.

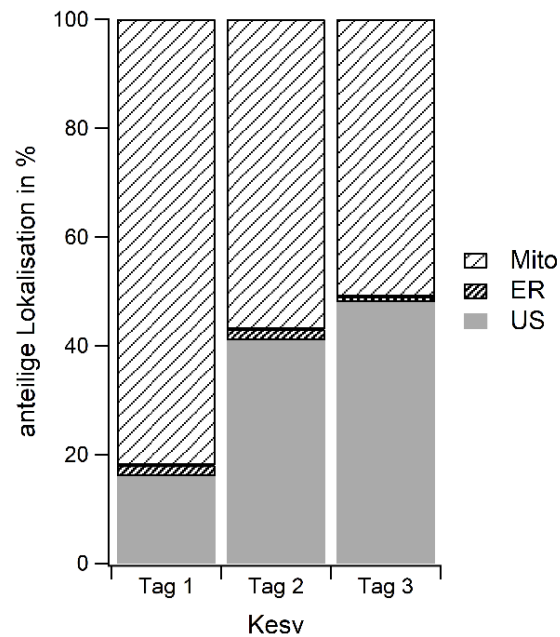


Abbildung 3.1.4: Prozentuale Verteilung von Kevs auf die Zellkompartimente an drei verschiedenen Betrachtungstagen

Aufgetragen ist die anteilige Lokalisation in Prozent von Kevs an drei unabhängigen Tagen (Tag 1: n= 63; Tag 2: n= 58; Tag 3: n= 53) im ER, in den Mitochondrien und im Cytosol von HEK293-Zellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Betrachtung an mindestens drei unabhängigen Versuchstagen durchaus sinnvoll ist, um ein stabileres Bild des Sortierungsverhältnisses über die Gesamtheit der Zellen zu erhalten. Aufgrund dieser Tatsache beruhen die statistischen Untersuchungen in dieser Arbeit, wenn nicht anders beschrieben, auf den Beobachtungen an mindestens drei verschiedenen Versuchstagen.

Da die Schwankungen des Sortierungsverhältnisses über mehrere Tage hinweg recht beachtlich sein können, werden nur deutliche Änderungen, wie z. B. das Wegfallen einer Sortierungspopulation, als Mittelwerte ohne Standardabweichung über die unterschiedlichen Versuchstage hinweg diskutiert.

Bei der Diskussion geringer Schwankungen wird der Mittelwert der Sortierungspopulation und die Standardabweichung über die verschiedenen Versuchstage oder zusätzlich die anteiligen Lokalisationen an den einzelnen Versuchstagen genannt.

Durch die statistische Untersuchung des Sortierungsverhältnisses von Kevs::eGFP soll im Gegensatz zur rein qualitativen Untersuchung der Sortierung ein besseres Verständnis darüber erlangt werden, wie stark das *targeting* von Kevs::eGFP in der Summe der HEK293-Zellen variiert. Dies wirft die Frage auf, welcher einzelne Faktor oder welche Kombination aus Faktoren in der einzelnen HEK293-Zelle dazu führt, den Sortierungsweg von Kevs::eGFP zu modifizieren.

3.2. Die Translationseffizienz hat keinen Einfluss auf die Sortierung von Kesv

Die Daten in **Abbildung 3.1.3** zeigen, dass Kesv eine duale Sortierung aufweist. Zwar liegt er zu 61 % in den Mitochondrien sortiert vor, jedoch ist er in 37 % der Fälle cytosolisch und in 2 % der Fälle ist sogar eine Lokalisation im ER zu beobachten.

Das folgende Kapitel zeigt, dass die Sortierung manipuliert werden kann. Die Gründe dafür sind zwar zu großen Teilen unbekannt, eine mögliche Ebene der Manipulation liegt jedoch in der Modulation der Codone.

Die Redundanz des genetischen Codes leitet sich aus der Tatsache ab, dass 64 Codone für lediglich 20 Aminosäuren und Translationsstop-Signale kodieren. Unterschiedliche Codone, die wiederum dieselbe Aminosäure kodieren, werden als synonyme Codone bezeichnet. Synonyme Codone führen somit im Grundsatz zwar zur selben Aminosäuresequenz, der Weg dorthin ist jedoch von Codon zu Codon und von Zelle zu Zelle ein anderer. So wird zum Beispiel seit 20 Jahren davon ausgegangen, dass synonyme Codone unterschiedlich schnell translatiert werden (Hanson & Collier, 2018). Dies leitet sich zum einen aus der codonspezifischen tRNA-Verfügbarkeit und zum anderen aus der stochastisch schwankenden Codon-Dekodierung der Ribosome ab. Somit kann ein Codon anhand der Erkennungseffizienz seiner tRNA durch das Ribosom als optimal oder nicht-optimal eingestuft werden (Hanson & Collier, 2018). Eine mögliche Quantifizierung dieser Eigenschaften wird durch den *Codon Adaptation Index* (CAI) geschaffen. Wird eine Sequenz aus Codonen generiert, die einen hohen CAI haben, so wird davon ausgegangen, dass die Translationsrate dieser Sequenz höher ist als die einer Sequenz, die auf Codonen mit niedrigem CAI generiert wurde. So wurde in einem zellfreien-Translationssystem gezeigt, dass eine codonoptimierte 1,6 kb-lange mRNA um 1,5 Minuten schneller translatiert wird als eine nicht-optimierte Kontrolle (Yu *et al.*, 2015).

Buhr *et al.* (2016) konnten zudem zeigen, dass eine alternative *codon usage* eines Proteins zu einer erhöhten Fehlfaltung und Degradation dieses Proteins führt.

Aus diesen Befunden formuliert sich die Hypothese, dass eine gezielte Änderung der Codone bezüglich ihres CAI, die damit einhergehende Veränderung der Translationseffizienz und die mögliche alternative Faltung von Kesv potenziell die Sortierung von Kesv modulieren.

3.2.1. Kesv_{opt}

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zunächst der synthetische Kanal Kesv_{opt} vergleichend mit Kesv untersucht. Die Basensequenz von Kesv_{opt} wurde dazu für eine Expression in humanen Zellen optimiert; die gewählten Codone haben einen hohen CAI und bilden zudem keine Motive aus, die der

Proteinexpression negativ entgegenwirken. Basierend auf bioinformatischen Berechnungen¹ hat Kesv_{opt} einen CAI von 0,97 und einen GC-Gehalt von 63 %. Im Gegensatz dazu, liegen der natürliche CAI von Kesv bei 0,68 und der GC-Gehalt bei 52 %.

Der erhöhte CAI und GC-Gehalt von Kesv_{opt} führen bei der Betrachtung von n=235 Kesv_{opt}::eGFP exprimierenden HEK293-Zellen zu einer deutlichen mitochondrialen Sortierung (siehe **Abbildung 3.2.3**). **Abbildung 3.2.1** zeigt exemplarisch zwei Kesv_{opt}::eGFP exprimierende HEK293-Zellen im Vergleich mit den Markerproteinen COXVIII::mCherry (**Abbildung 3.2.1 (B)**) und KDEL::mCherry (**Abbildung 3.2.1 (E)**).

Auffällig ist hier, dass die Hintergrundfluoreszenz des Kesv_{opt}::eGFP oftmals geringer ist als die des COXVIII::mCherry und in allen Fällen schwächer als bei Kesv::eGFP.

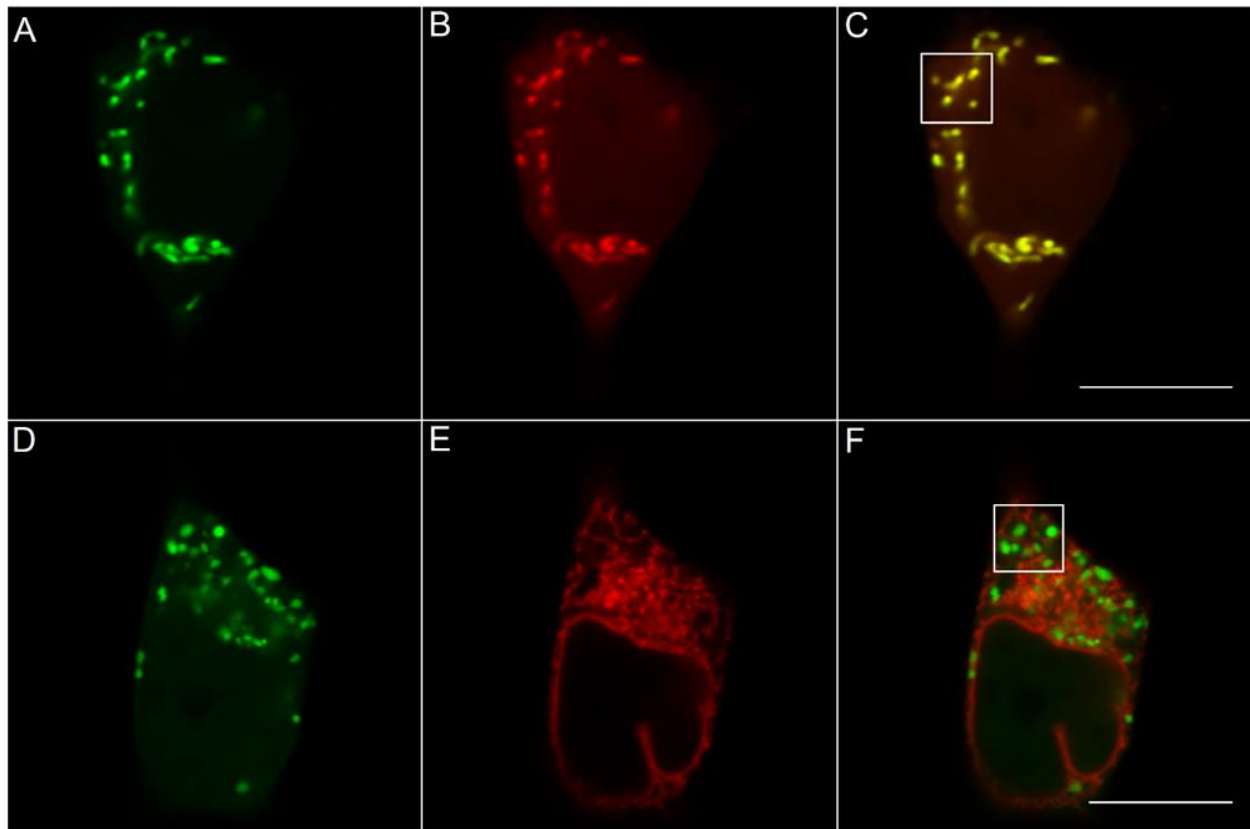


Abbildung 3.2.1: Lokalisation von Kesv_{opt}::eGFP

Exemplarische CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit Kesv_{opt}::eGFP und entweder mit COXVIII::mCherry oder KDEL::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) und (D) zeigen den mitochondrial sortierten Kesv_{opt}::eGFP. (B) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry. (E) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein KDEL::mCherry (C) und (F) zeigen die jeweiligen *Overlays* der Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 µm. Die Kästen in (C) und (F) markieren den vergrößerten Bereich, der in **Abbildung 3.2.2** untersucht wird.

¹ <https://www.biologicscorp.com/tools/CAICalculator> (Stand: 17.06.2018)

<https://www.biologicscorp.com/tools/GCContent/#.W8bvWvaYS70> (Stand: 17.06.2018)

Der visuelle Eindruck, dass Kesv_{opt}::eGFP mitochondrial sortiert vorliegt, wird durch die jeweiligen Kolokalisationsprofile mit COXVIII::mCherry und KDEL::mCherry (**Abbildung 3.2.2 (A) und (B)**) untermauert. Die Fluoreszenzmaxima und -minima von Kesv_{opt}::eGFP und COXVIII::mCherry liegen deutlich übereinander. Im Vergleich mit KDEL::mCherry weist Kesv_{opt}::eGFP meist dann ein Fluoreszenzmaximum auf, wenn das mCherry-Signal sein Minimum erreicht. Der *Pearson Correlations Coefficient* (PCC), der über den vergrößerten Bereich bestimmt worden ist, bestätigt die positive Korrelation der Fluoreszenzsignale von Kesv_{opt}::eGFP und COXVIII::mCherry (PCC= 0,9) sowie die negative Korrelation zwischen Kesv_{opt}::eGFP und KDEL::mCherry (PCC= -0,07). Von einer Korrelation, die durch eine Kolokalisation von zwei Proteinen zustande kommt, kann ab einem PCC von 0,4 gesprochen werden (Bolte & Cordelières, 2006).

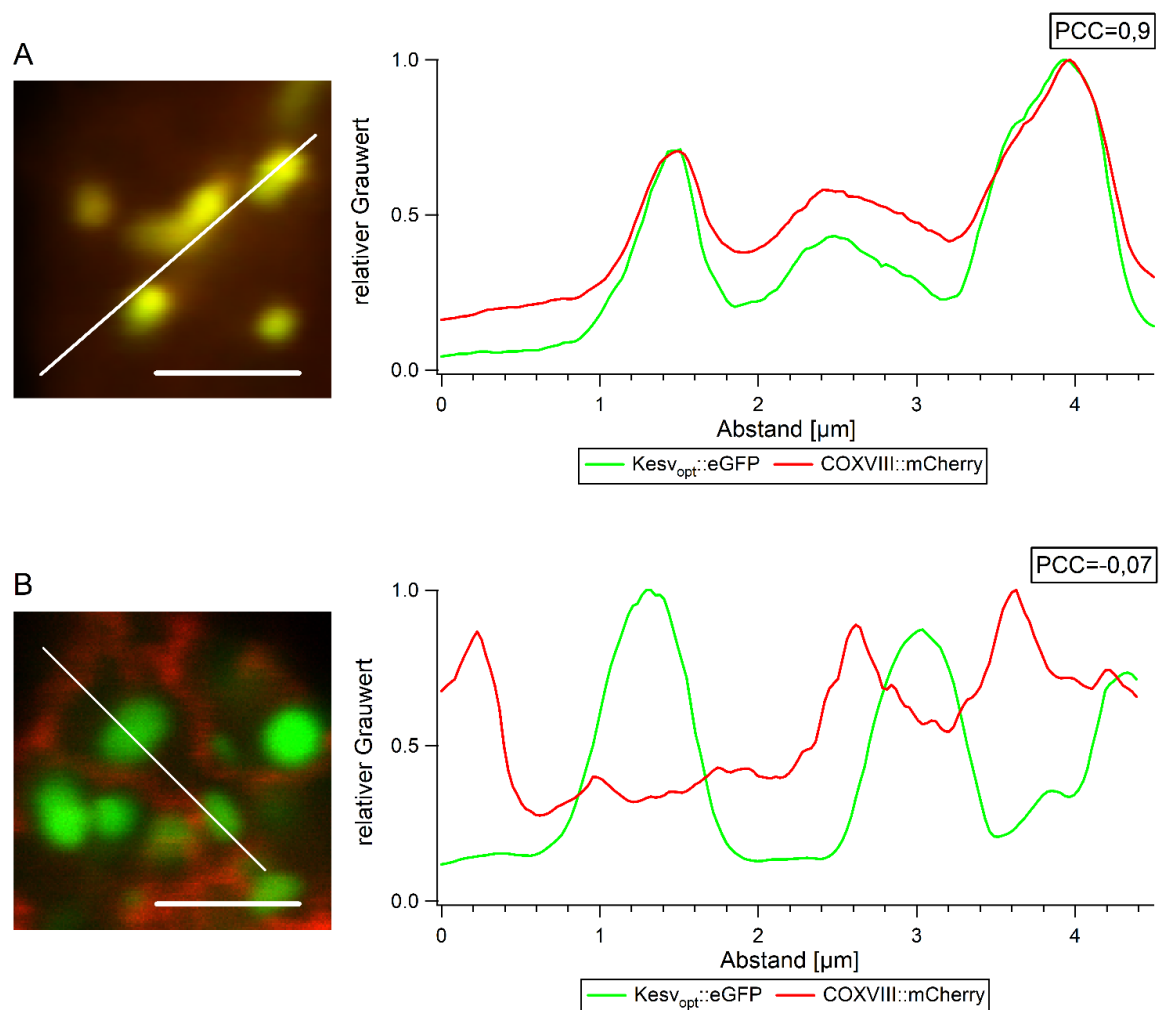


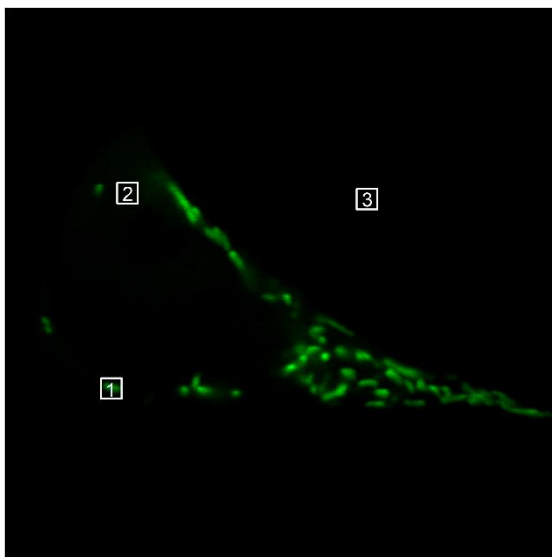
Abbildung 3.2.2: Lokalisationsstudie von Kesv_{opt}::eGFP mittels Markerproteinen

Vergrößerung des in **Abbildung 3.2.1 (C) und (F)** markierten Kastens von mit Kesv_{opt}::eGFP ((A) und (B)) und entweder mit COXVIII::mCherry (A) oder KDEL::mCherry (B) co-transfizierten HEK293-Zellen. Der Größenbalken entspricht 2 µm. Die entsprechenden Grauwertverläufe der in (A) und (B) gezeigten Linienprofile für eGFP (grün) und mCherry (rot) verdeutlichen die positive (A) und negative (B) Korrelation zwischen Kesv_{opt}::eGFP und dem jeweiligen Markerprotein. Dieser Eindruck wird durch die entsprechenden PCCs validiert.

Der nur gering negative PCC zwischen mitochondrial-sortierten Kesv_{opt} und KDEL::mCherry ist auf die schlechte Auflösung der Mitochondrien und ER-Struktur zurückzuführen, weswegen ein PCC unter 0,4 bereits als fehlende Korrelation zu bewerten ist.

Der visuelle Eindruck wird demnach quantitativ über den PCC bestätigt.

Um den Eindruck, dass die Expression von Kesv::eGFP eine höhere Hintergrundfluoreszenz in der Zelle generiert bzw. der Kontrast zwischen Mitochondrien und der Hintergrundfluoreszenz in der Zelle bei Expression von Kesv_{opt} größer ist als bei Kesv, zu quantifizieren, wurden je zehn Zellen wie folgt vermessen. Wie schematisch in **Abbildung 3.2.3** dargestellt, wurde die mittlere Signalintensität von drei charakteristischen *regions of interest* (ROIs), für die Mitochondrien (1), das Cytosol (2) bzw. den Hintergrund außerhalb der Zelle (3) gemessen. Die Werte der zellulären Strukturen wurden dann auf den Wert des Bildhintergrunds normiert (1-3 bzw. 2-3), um so die mittlere Fluoreszenzintensität in den Mitochondrien ins Verhältnis zu der Zell-Hintergrundfluoreszenz zu setzen.



$$\frac{(Intensität_{Mito} - Intensität_{Hintergrund})}{(Intensität_{Cyto} - Intensität_{Hintergrund})} = \frac{(1 - 3)}{(2 - 3)}$$

Abbildung 3.2.3: Beispielhaftes Schema zur Berechnung des Intensitätsverhältnisses zwischen mitochondrialer und cytosolischer Fluoreszenzintensität

Links: Dargestellt ist eine Kesv_{opt}::eGFP exprimierende HEK293-Zelle. (1) ROI um ein Mitochondrium, (2) ROI im Cytosol und (3) ROI im Bildhintergrund. **Rechts:** Formel zur Bestimmung des, auf die Hintergrundfluoreszenz normierten, Fluoreszenzintensitätsverhältnisses von mitochondrialer und cytosolischer eGFP-Fluoreszenz.

Dies wurde sowohl mit zehn zufällig ausgewählten Kesv::eGFP, als auch mit zehn entsprechenden Kesv_{opt}::eGFP exprimierenden Zellen getan und der Mittelwert sowie die Standardabweichung des Verhältnisses bestimmt. Die mittlere Fluoreszenzintensität der Mitochondrien in Kesv_{opt} exprimierenden Zellen erweist sich dabei als $6,3 \pm 2,5$ mal höher als die des Cytosols. Im Vergleich dazu, ist die mittlere Fluoreszenzintensität der Mitochondrien von Kesv exprimierenden Zellen nur $1,6 \pm 0,4$ mal höher als die

des Cytosols. Kesv weist also, im Vergleich zu Kesv_{opt}, quantitativ nachweisbar bei einer Sortierung in die Mitochondrien eine höhere cytosolische Hintergrundfluoreszenz auf.

Ermittelt man bei denselben Zellen das Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität des Cytosols gegenüber der Hintergrundfluoreszenz, so zeigt sich im Fall von Kesv, dass die mittlere Fluoreszenzintensität des Cytosols lediglich $75,3 \pm 62,1$ mal höher ist als der Hintergrund.

Dahingegen ist sie bei Kesv_{opt} um das $1087,3 \pm 910$ -fache erhöht. Dies scheint zunächst kontraintuitiv, jedoch beruht das deutlich erhöhte Verhältnis im Falle von Kesv_{opt} nicht auf einen erhöhten cytosolischen Wert, sondern ist darauf zurückzuführen, dass bei Aufnahme von Kesv_{opt} ein deutlich niedriger *gain* eingestellt werden kann. Der wiederum führt, im Gegensatz zu Kesv, zu einer minimalen Hintergrundfluoreszenz. Den absoluten Werten nach, ist die cytosolische Fluoreszenzintensität in allen Fällen bei Expression von Kesv::eGFP höher. Worauf die deutliche Hintergrundfluoreszenz von Kesv zurückzuführen ist, wird in einem späteren Abschnitt dieser Arbeit näher untersucht.

Die statistische Auswertung von n=235 mit Kesv_{opt}::eGFP transfizierten Zellen zeigt für das Codon-optimierte Protein eine mitochondriale Sortierung (siehe **Abbildung 3.2.4.**) von 100%. Somit geht durch die Codonoptimierung von Kesv der Anteil der Zellen, die als ER-sortiert und unsortiert kategorisiert werden, verloren.

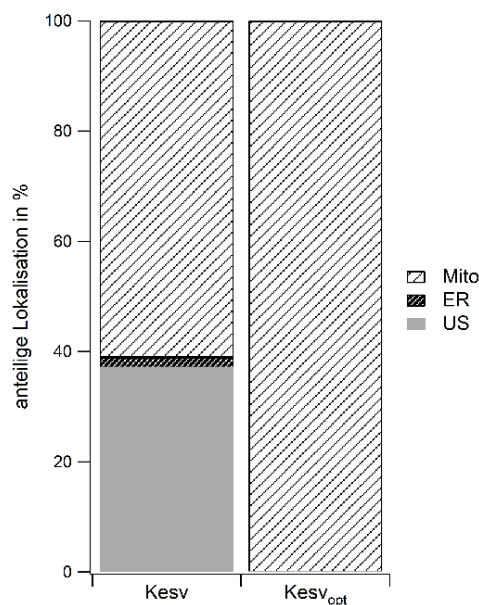


Abbildung 3.2.4: Prozentuale Sortierungsverteilung von Kesv_{opt} im Vergleich zu Kesv

Dargestellt ist die anteilige Lokalisation in Prozent von Kesv (n=259) und Kesv_{opt} (n=135) im ER, in den Mitochondrien und im Cytosol von HEK293-Zellen.

Als erstes Resümee kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass die gezeigten Ergebnisse darauf hindeuten, dass die gezielte Optimierung der Codone durchaus Einfluss auf das Sortierungsverhalten von Kesv hat. Die klare mitochondriale Sortierung und die Verringerung der Hintergrundfluoreszenz lässt auf eine, durch die erhöhte Expressionseffizienz und somit schnellere Translation, effektivere posttranslationale Sortierung in die Mitochondrien schließen.

Im Anschluss wurden verschiedene Versuche durchgeführt, die unterschiedliche Eigenschaften von Kesv und Kesv_{opt} vergleichen sollen.

Die Experimente sollten die folgenden Faktoren näher untersuchen:

- A: Einfluss von Codonoptimierung auf die Expressionsgeschwindigkeit
- B: Einfluss von Codonoptimierung auf die Transfektionseffizienz
- C: Einfluss von Codonoptimierung auf die Funktionalität von Kesv in den Mitochondrien
- D: Effizienz der Sortierung von Kesv_{opt}::eGFP als Funktion der Wachstumstemperatur
- E: Einfluss der Codonoptimierung auf die Proteinsortierung von Kesv in unterschiedlichen Zelltypen

A: Einfluss von Codonoptimierung auf die Expressionsgeschwindigkeit

Zunächst wurde der zeitliche Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der beiden Konstrukte verglichen. Hierfür wurden jeweils 100 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (4 h, 5 h und 6 h) nach Transfektion mittels CLSM aufgenommen und deren relative Fluoreszenzintensität als Boxplot aufgetragen (siehe **Abbildung 3.2.5**). Bei beiden Konstrukten konnte nach 4 h noch keine Fluoreszenz festgestellt werden. Die relative Fluoreszenzintensität ist bei Kesv_{opt}::eGFP mit einem Median von 7 bereits nach 5 h höher als bei Kesv::eGFP 6 h (Median=2,5) nach Transfektion. Zudem steigt die relative Fluoreszenzintensität bei Kesv_{opt}::eGFP innerhalb einer Stunde auf einen Median von 12, während sie bei Kesv::eGFP annähernd gleichbleibend ist. Bei Kesv_{opt}::eGFP war bei allen betrachteten Zellen bereits nach 5 h eine Sortierung in die Mitochondrien zu beobachten wobei, zu diesem Zeitpunkt das Fluoreszenzsignal von Kesv::eGFP meist cytosolisch vorlag (siehe **Abbildung 3.2.5**).

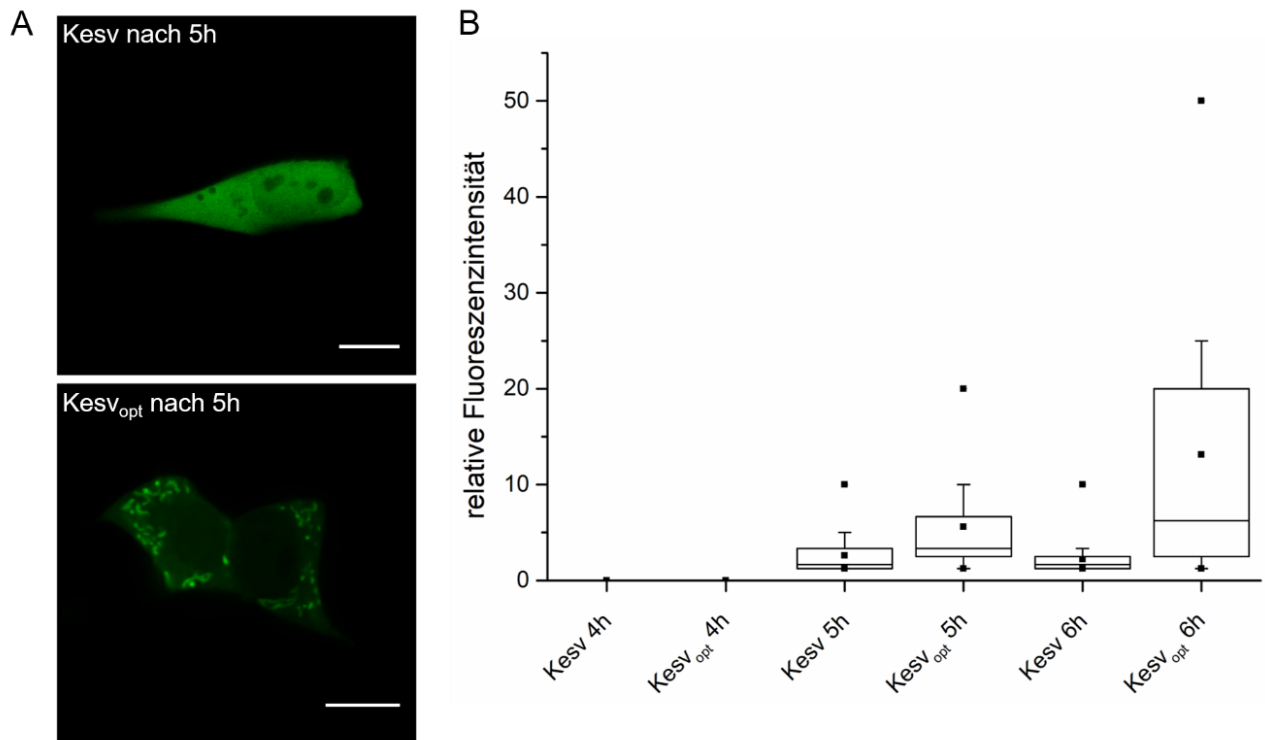


Abbildung 3.2.5: Expressionseffizienz von Kesv bzw. Kesv_{opt} zu verschiedenen Zeitpunkten

(A) Exemplarische Kesv::eGFP und Kesv_{opt}::eGFP exprimierende HEK293-Zellen 5 h nach Transfektion. Die Größenbalken entsprechen 10 µm. (B) Es wurden insgesamt je n=100 HEK293-Zellen 4 h, 5 h oder 6 h nach Transfektion mit Kesv::eGFP bzw. Kesv_{opt}::eGFP untersucht und deren relative Fluoreszenz als Boxplot aufgetragen.

Die Daten weisen darauf hin, dass die Codonoptimierung von Kesv in der Tat eine Steigerung der Expressionseffizienz von Kesv zur Folge hat, die sich in einer früher und stärker auftretenden relativen Fluoreszenzintensität äußert.

B: Einfluss von Codonoptimierung auf Transfektionseffizienz

Neben der Expressionseffizienz zu verschiedenen Zeitpunkten wurde zeitgleich auch die Transfektionseffizienz verglichen. Hierfür wurden, nachdem 100 Zellen zur Ermittlung der relativen Fluoreszenzintensität aufgenommen worden sind, alle restlichen fluoreszierenden Zellen pro Coverslip gezählt. Dies wurde an drei unabhängigen Versuchstagen getan und als Boxplot aufgetragen (**Abbildung 3.2.6**). Fünf Stunden nach Transfektion zeigt sich bei der Transfektionseffizienz noch kein Unterschied zwischen Kesv::eGFP und Kesv_{opt}::eGFP - in dem Scatterplot liegt der Mittelwert auf der Winkelhalbierenden. Schon eine Stunde später ist die Anzahl transfizierter Zellen bei Kesv_{opt}::eGFP von 220 auf 520 und bei Kesv::eGFP lediglich von 210 auf 320 Zellen angestiegen. Im Scatterplot liegt der Mittelwert mit den Standardabweichungen deutlich oberhalb der Winkelhalbierenden.

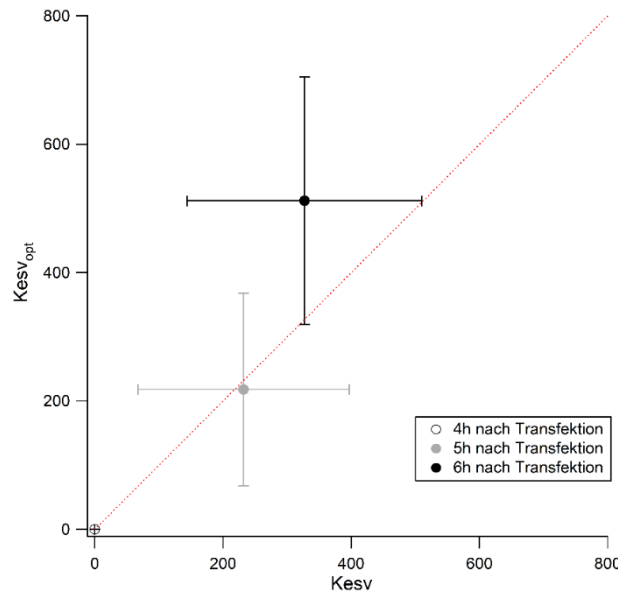


Abbildung 3.2.6: Transfektionseffizienz von Kesv::eGFP bzw. Kesv_{opt}::eGFP zu verschiedenen Zeitpunkten

Es wurden jeweils alle fluoreszierenden Zellen auf einem Coverslip pro Kondition an 3 Versuchstagen gezählt und gegeneinander aufgetragen.

Die Daten zeigen, dass eine Codonoptimierung von Kesv für humane Zellsysteme nicht nur in einer effektiveren Sortierung in die Mitochondrien resultiert, sondern auch zu einer höheren und früher auftretenden relativen Fluoreszenzintensität führt. Ferner erhöht sich durch diese Manipulation die Transfektionseffizienz. Diese Daten sind im Einklang mit der Hypothese, dass eine Codonoptimierung die Translationsgeschwindigkeit beschleunigt.

C: Einfluss von Codonoptimierung auf die Funktionalität von Kesv in den Mitochondrien

In vorangegangenen Studien, bei denen Kesv via *Patch Clamp* elektrophysiologisch charakterisiert werden sollte (Mehmel, 2004), konnte keine signifikante Kesv induzierte Leitfähigkeit festgestellt werden. Dies kann auf seine Lokalisation in den Mitochondrien zurückgeführt werden, da via *Patch Clamp* in der *whole cell*-Konfiguration nur aktive Kanäle in der Plasmamembran detektiert werden können (Hamill *et al.*, 1981).

Eine Möglichkeit dennoch die Aktivität von Kesv in den Mitochondrien zu messen besteht in der Registrierung des mitochondrialen Membranpotentials. Da der Kanal mit hoher Wahrscheinlichkeit in die innere Membran der Mitochondrien sortiert wird (Balss *et al.*, 2008), ist anzunehmen, dass ein aktiver K⁺-Kanal zu einer Depolarisation der Mitochondrien führt. Die relative Polarisierung der Mitochondrien kann in intakten Zellen mit Potential-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffen, wie z. B. Tetramethylrhodamin-methylester (TMRM), gemessen werden.

TMRM ist ein Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoff, der aufgrund seiner positiven Ladung in gesunden Mitochondrien akkumuliert (Scaduto & Grotoyohann, 1999). Kommt es, z. B. aufgrund von Apoptose, zu einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials, nimmt auch die Fluoreszenzintensität von TMRM in den Mitochondrien ab (Scaduto & Grotoyohann, 1999).

Um den Einfluss von Kesv auf die Polarisierung der Mitochondrien zu ermitteln, wurde die TMRM-induzierte Fluoreszenzintensität in HEK293-Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dazu wurden die Zellen, die Kesv::eGFP oder Kesv_{opt}::eGFP exprimieren, mit untransfizierten bzw. ungefärbten (US) Kontrollmessungen verglichen. Als weitere Referenz dienten HEK293-Zellen, in denen das Membranpotential in den Mitochondrien durch den Entkoppler Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazon (CCCP) depolarisiert worden war. **Abbildung 3.2.7** zeigt die Ergebnisse einer typischen Messung. Die Fluoreszenzintensitätskurven von Kesv (grün) und Kesv_{opt} (rot) exprimierenden Zellen verlaufen im Vergleich zur Fluoreszenzintensitätskurve untransfizierter HEK293-Zellen (schwarz) ähnlich. Die Fluoreszenzintensitätskurve der CCCP-behandelten Probe (dunkelgrau) ist, wie zu erwarten, nach links verschoben. Jedoch ist die Fluoreszenzintensität noch höher als die der ungefärbten Probe (hellgrau) und zeigt somit die deutliche Depolarisation der Mitochondrien.

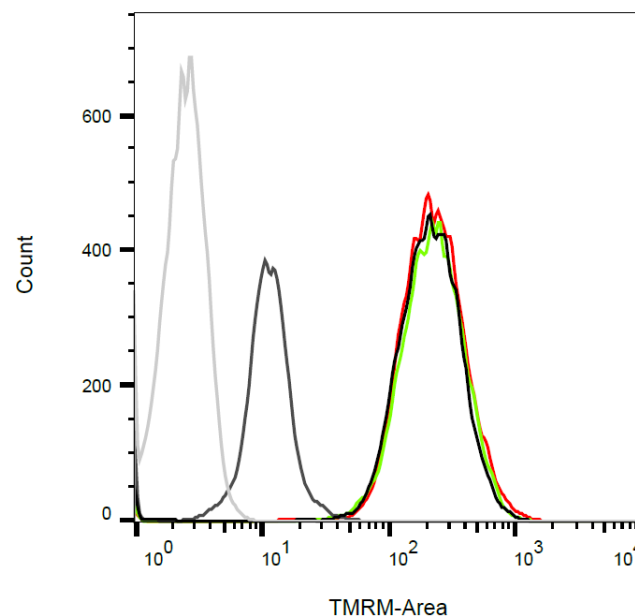


Abbildung 3.2.7: FACS Messung von Kesv::eGFP bzw. Kesv_{opt}::eGFP exprimierender HEK293-Zellen mittels TMRM

Das mitochondriale Membranpotential zeigt sowohl bei Kesv::eGFP (grün), als auch bei Kesv_{opt}::eGFP (rot) transfizierten HEK293-Zellen keine Veränderung im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle (schwarz). Die Mitochondrien der mit CCCP behandelten Zellen (dunkelgrau) sind deutlich depolarisierter als die untransfizierter HEK293-Zellen (schwarz). Die Fluoreszenzintensität liegt bei allen Proben jedoch über der Hintergrundfluoreszenz von unbehandelten HEK293-Zellen (Hellgrau).

Die Experimente zeigen, dass weder Kesv noch Kesv_{opt} exprimierende HEK293-Zellen eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials, im Vergleich zu untransfizierten HEK293-Zellen, aufweisen. Dies lässt darauf schließen, dass weder Kesv und noch Kesv_{opt} eine ausschlaggebende Ionen-Leitfähigkeit in der inneren Membran der Mitochondrien induzieren, weshalb der putative Einfluss der Codonoptimierung auf die Funktionalität so nicht untersucht werden kann.

Da mehrere Beispiele aus der Literatur den negativen Einfluss eines GFP-tags auf die Funktionalität diverser Ionenkanäle postulieren (Kupper, 2001; Meyer & Fromherz, 2001) wurde im Folgenden das eGFP-tag sowohl bei Kesv, als auch bei Kesv_{opt} entfernt und das mitochondriale Membranpotential erneut vermessen (siehe **Abbildung 3.2.8**).

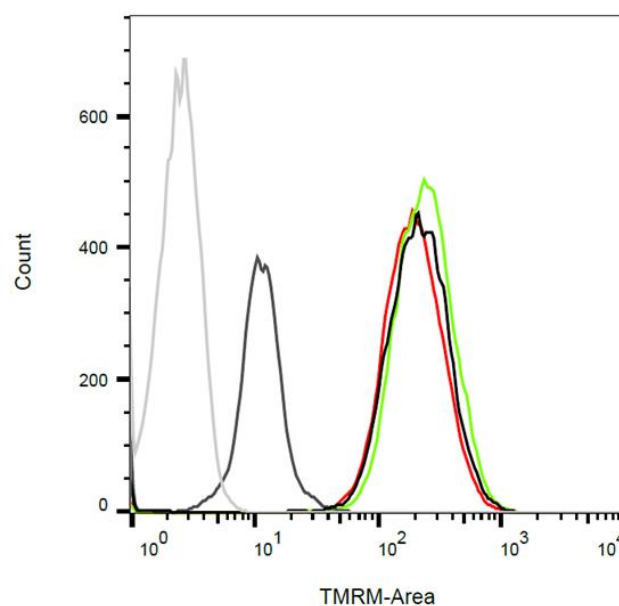


Abbildung 3.2.8: FACs Messung von Kesv bzw. Kesv_{opt} exprimierender HEK293-Zellen, ohne eGFP-tag, mittels TMRM

Das mitochondriale Membranpotential zeigt sowohl bei Kesv (grün) als auch bei Kesv_{opt} (rot) transfizierten HEK293-Zellen keine Veränderung im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle (schwarz). Die Mitochondrien der mit CCCP behandelten Zellen (dunkelgrau) sind deutlich depolarisierter als die untransfizierten HEK293-Zellen (schwarz). Die Fluoreszenzintensität liegt bei allen Proben über der Hintergrundfluoreszenz von unbehandelten HEK293-Zellen (hellgrau).

Die in **Abbildung 3.2.8** dargestellten Daten zeigen, dass weder Kesv noch Kesv_{opt} exprimierende HEK293-Zellen auch ohne Fusion mit eGFP eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials im Vergleich zu untransfizierten HEK293-Zellen hervorrufen. Dies lässt darauf schließen, dass auch in diesem Fall weder Kesv noch Kesv_{opt} eine ausschlaggebende Ionen-Leitfähigkeit über die mitochondriale Membran induzieren. Dies kann nicht durch eine potenzielle Behinderung durch das fusionierte eGFP erklärt werden. Der putative Einfluss der Codonoptimierung auf die Funktionalität von Kesv kann über die Vermessung des mitochondrialen Membranpotentials mittels Durchflusszytometrie nicht abschließend geklärt werden.

D: Effizienz der Sortierung von Kesv_{opt}::eGFP als Funktion der Wachstumstemperatur

Wie bereits gezeigt, führt die Codonoptimierung von Kesv zu einer effektiveren Sortierung in die Mitochondrien. Yu *et al.* (2015) demonstrierten, dass *codon usage* die Proteinfunktion regulieren kann, indem sie die cotranslationale Proteinfaltung beeinflusst. So werden unstrukturierte Proteinregionen bevorzugt durch nicht-optimale Codone und strukturell anspruchsvolle Regionen meist durch häufig genutzte Codone kodiert (Zhou *et al.*, 2015). Neben der *codon usage* ist die Temperatur ein bekannter Faktor, der die Syntheserate von Proteinen moduliert (Farewell & Neidhardt, 1998) und somit potenziell auch deren Faltungsprozess bestimmen kann. Im Folgenden wurde daher der Einfluss einer deutlich verringerten Wachstumstemperatur (25 °C) auf die Lokalisation von Kesv und Kesv_{opt} untersucht (siehe **Abbildung 3.2.9**). HEK293-Zellen wurden mit Kesv::eGFP oder Kesv_{opt}::eGFP transfiziert und nach 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt, für mindestens 16 h bei 25 °C in CO₂-gepufferten Medium inkubiert. Als Kontrollen dienten HEK293-Zellen, an denen 4 h nach Transfektion mit Kesv::eGFP oder Kesv_{opt}::eGFP ein Medienwechsel in CO₂-gepuffertes Medium durchgeführt wurde, jedoch kein Temperaturwechsel vorgenommen wurde. Das Experiment wurde an drei unabhängigen Tagen wiederholt (N=3).

Die mit Kesv::eGFP und Kesv_{opt}::eGFP transfizierten und bei 37 °C gehaltenen Kontrollzellen zeigten in der relativen Lokalisation der Kanalproteine keine erheblichen Abweichungen zu den in **Abbildung 3.2.4** gezeigten Werte. Kesv::eGFP ist bei 37 °C in CO₂-gepuffertem Medium zu 68±9 % in den Mitochondrien lokalisiert, zu 10±3,3 % im ER und zu 22±8,5 % unsortiert zu beobachten, wohingegen Kesv_{opt}::eGFP auch hier zu 100±0 % in die Mitochondrien sortiert wird.

Bei einer Wachstumstemperatur von 25 °C in CO₂-gepuffertem Medium sinkt der mitochondrial sortierte Anteil bei Kesv auf 18±3,8 %. Der Anteil der Zellen, die eine ER-Sortierung zeigen steigt dagegen leicht auf 13±5,4 %. Der Anteil an Zellen mit unsortiert vorliegendem Kanal steigt unter diesen Bedingungen jedoch deutlich auf 69±2,2 % an.

Die wichtigste Erkenntnis aus diesen Versuchen ist, dass die Sortierung des Kanals temperaturabhängig ist und dass mit abnehmender Wachstumstemperatur die mitochondriale Sortierung ab- und die zum ER leicht zunimmt.

Für Kesv_{opt} lässt sich bei einer Verringerung der Wachstumstemperatur eine ähnliche Tendenz erkennen. Der Anteil der Zellen mit einer mitochondrialen Lokalisation des Kanals sinkt von 100±0 % auf 48±14,4 %. Bei der niedrigen Temperatur ist Kesv_{opt} das erste Mal bei 19±16,6 % der betrachteten Zellen auch im ER lokalisiert. Ferner wächst der Anteil an Zellen, die ein flächiges Fluoreszenzsignal als Merkmal einer Fehlsortierung zeigen, auf 33±7,6 % an.

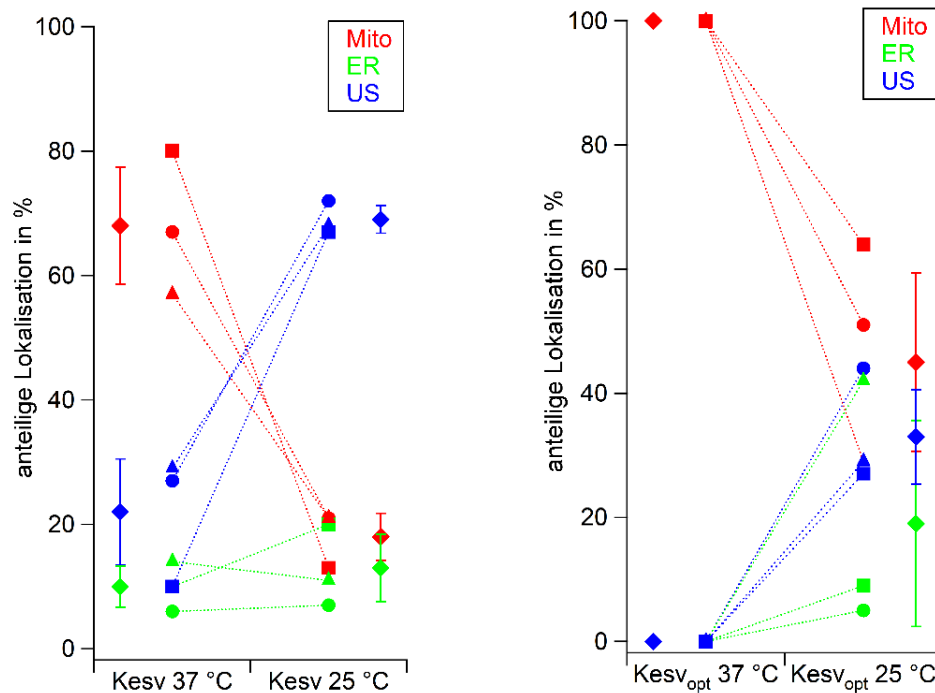


Abbildung 3.2.9: Prozentuale Sortierungsverteilung von Kesv bzw. Kesv_{opt} bei 37 und 25 °C Wachstumstemperatur

Dargestellt ist die anteilige Lokalisation in Prozent von Kesv (**links**) bei einer Wachstumstemperatur von 25 °C (n=63) bzw. 37 °C (n=57) und Kesv_{opt} (**rechts**) bei einer Wachstumstemperatur von 25 °C (n=68) bzw. 37 °C (n=70) an jeweils drei unabhängigen Versuchstagen (N=3, ●= Tag 1; ■= Tag 2; ▲= Tag 3) im ER (grün), in den Mitochondrien (rot) und im Cytosol (blau) von HEK293-Zellen, sowie der Mittelwert (♦) und die Standardabweichung der jeweiligen Sortierungspopulation.

Die Daten zeigen, dass eine Herabsetzung der Wachstumstemperatur für beide Konstrukte zu einer Erniedrigung des mitochondrialen und einer Erhöhung des ER- bzw. unsortierten-Anteils führt.

Daraus kann man schließen, dass der mitochondriale Sortierungsweg der energetisch anspruchsvollere ist. Vor dem Hintergrund der oben formulierten Arbeitshypothese, kann aus den Daten geschlossen werden, dass die Beschleunigung der Translationsgeschwindigkeit - sowohl durch die Optimierung der Codone als auch mittels der erhöhten Temperatur - den gleichen Effekt haben.

Bei erhöhter Translationsgeschwindigkeit und niedrigen Wachstumstemperaturen oder durch sub-optimale Codone wie im Kesv WT-Kanal, wird das Gleichgewicht hin zu einer vermehrten Sortierung ins ER verschoben. An dieser Stelle kann man spekulieren, dass die Verlangsamung der Translationsgeschwindigkeit des Kesv_{opt} dazu führt, dass das SRP oder alternative cotranslationale Sortierungsfaktoren mehr Zeit haben, an das naszierende Protein zu binden und so einen cotranslationalen-Transport ins ER zu ermöglichen. Dies liegt im Einklang mit Befunden, die zeigen, dass eine schnelle Translation die Bindung von cotranslationalen Sortierungsfaktoren verhindert und somit eine cotranslationale Sortierung unterbindet (Pechmann *et al*, 2014).

E: Einfluss der Codonoptimierung auf die Proteinsortierung von Kesv in unterschiedlichen Zelltypen

In HEK293-Zellen zeigt Kesv::eGFP die in **Abbildung 3.1.3** beschriebene komplexe Sortierung mit einer bevorzugten Lokalisation in den Mitochondrien. Da Kesv_{opt} für die Expression in Humanzellen optimiert wurde, ist es von Interesse, den Einfluss der Optimierung auf die Proteinsortierung in anderen humanen Zelllinien verschiedener Gewebetypen (HaCaT, HeLa, A549) zu überprüfen. Zudem wurde eine weitere tierische Zelllinie (COS-7) gewählt, um den Einfluss der Codonoptimierung auf nicht humane Zellen vergleichend zu untersuchen.

Alle Zelllinien wurden zunächst mit Kesv::eGFP bzw. Kesv_{opt}::eGFP transient transfiziert und mindestens >50 Zellen bezüglich ihrer eGFP Lokalisation statistisch wie in **Abbildung 3.1.1** ausgewertet. **Abbildung 3.2.10** zeigt, jeweils exemplarisch mit Kesv::eGFP transfizierte HaCaT- (A-F) und HeLa-Zellen (G-L). **Abbildung 3.2.11** hingegen zeigt, auch jeweils exemplarisch, mit Kesv::eGFP transfizierte A549- (A-F) und COS7-Zellen (G-L). In allen vier Zelllinien zeigt sich Kesv sowohl in den Mitochondrien ((A) bzw. (G)) als auch unsortiert ((D) bzw. (J)). Der Vergleich mit dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry ((B) bzw. (H)) validiert die Sortierung von Kesv in die Mitochondrien; die Lokalisation von eGFP- und mCherry-Signal sind annähernd deckungsgleich ((C) bzw. (I)). Die flächig verteilte Fluoreszenz über die gesamte Zelle, die in Kesv::eGFP transfizierten HEK293-Zellen beobachtet wurde, ist auch in den alternativen Zelllinien als Hintergrund zu der Akkumulation des Proteins in den Mitochondrien auffällig. Als weitere Beobachtung kann festgestellt werden, dass, anders als in HEK293-Zellen, in keiner der alternativen Zelllinien eine Sortierung in das ER zu beobachten ist.

In weiteren Versuchen wurde überprüft, ob die bevorzugte Sortierung des codonoptimierten Kanals in die Mitochondrien Zelltyp-abhängig ist.

Abbildung 3.2.12 zeigt beispielhaft Kesv_{opt}::eGFP transfizierte Zellen, der Zelllinien HaCaT (A-C), HeLa (D-F), A549 (G-I) und COS-7 (J-L). Ähnlich wie in HEK293-Zellen, zeigt sich Kesv_{opt} auch in den alternativen Zelllinien mitochondrial sortiert ((A), (D), (G) und (J)). Dieser Eindruck wird durch die Überlagerung des eGFP- und mCherry-Signals ((B), (E), (H) und (K)) bestätigt. Die deutlich geringere Hintergrundfluoreszenz von Kesv_{opt}::eGFP spricht für eine Zelllinien-unabhängige, effektive Sortierung in die Mitochondrien.

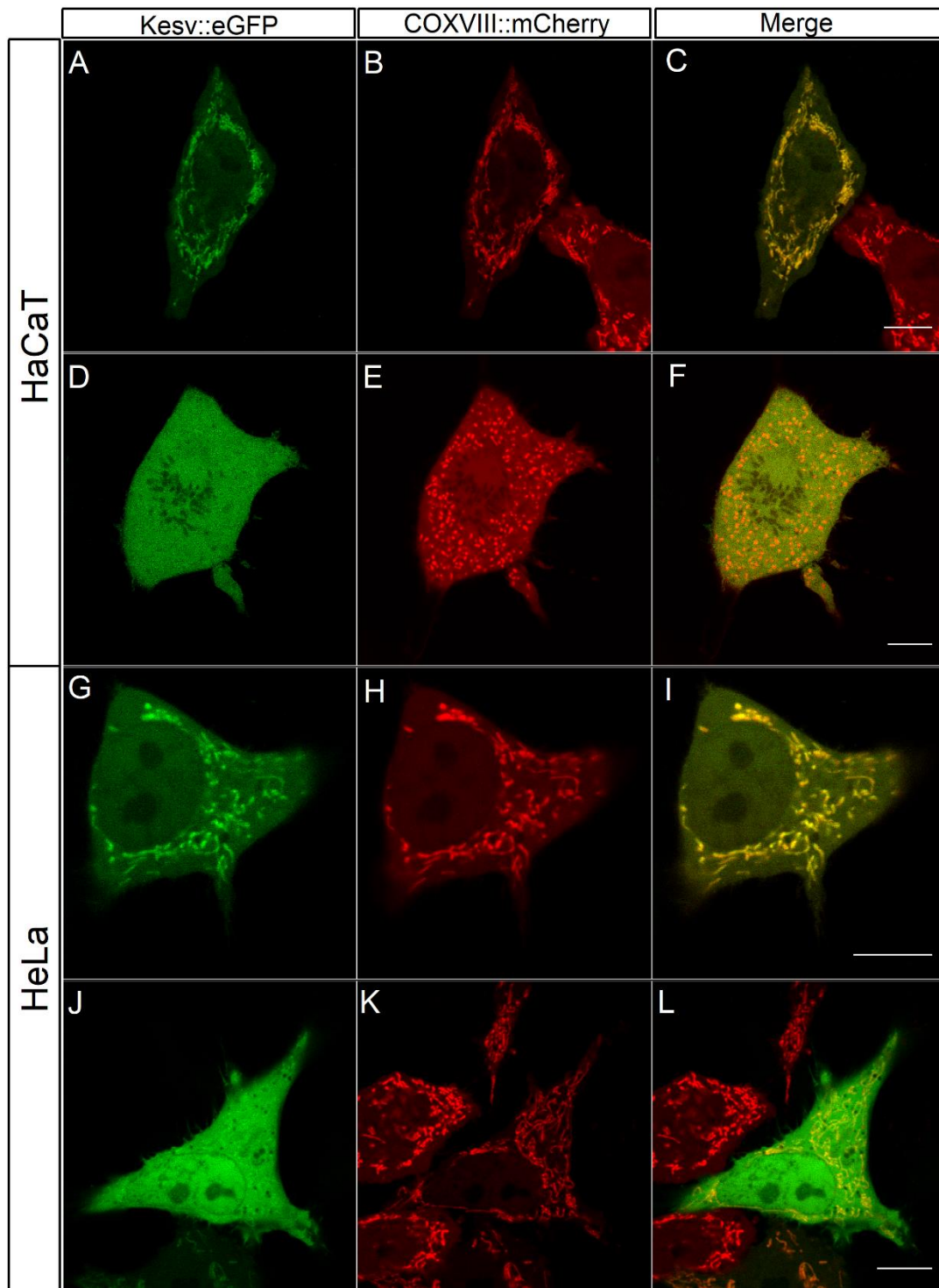


Abbildung 3.2.10: Lokalisation von Kesv::eGFP in HaCaT- und HeLa-Zellen

CLSM-Aufnahmen von HaCaT- und HeLa-Zellen, die mit Kesv::eGFP und COXVIII::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt Kesv::eGFP mitochondrial und (D) unsortiert in HaCaT-Zellen. (B) bzw. (E) zeigen die entsprechenden Zellen mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (C) bzw. (F) das *Overlay* beider Kanäle. (G) zeigt Kesv::eGFP mitochondrial und (J) unsortiert in HeLa-Zellen. (H) bzw. (K) zeigen die entsprechenden Zellen mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (I) bzw. (L) das *Overlay* beider Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 μm .

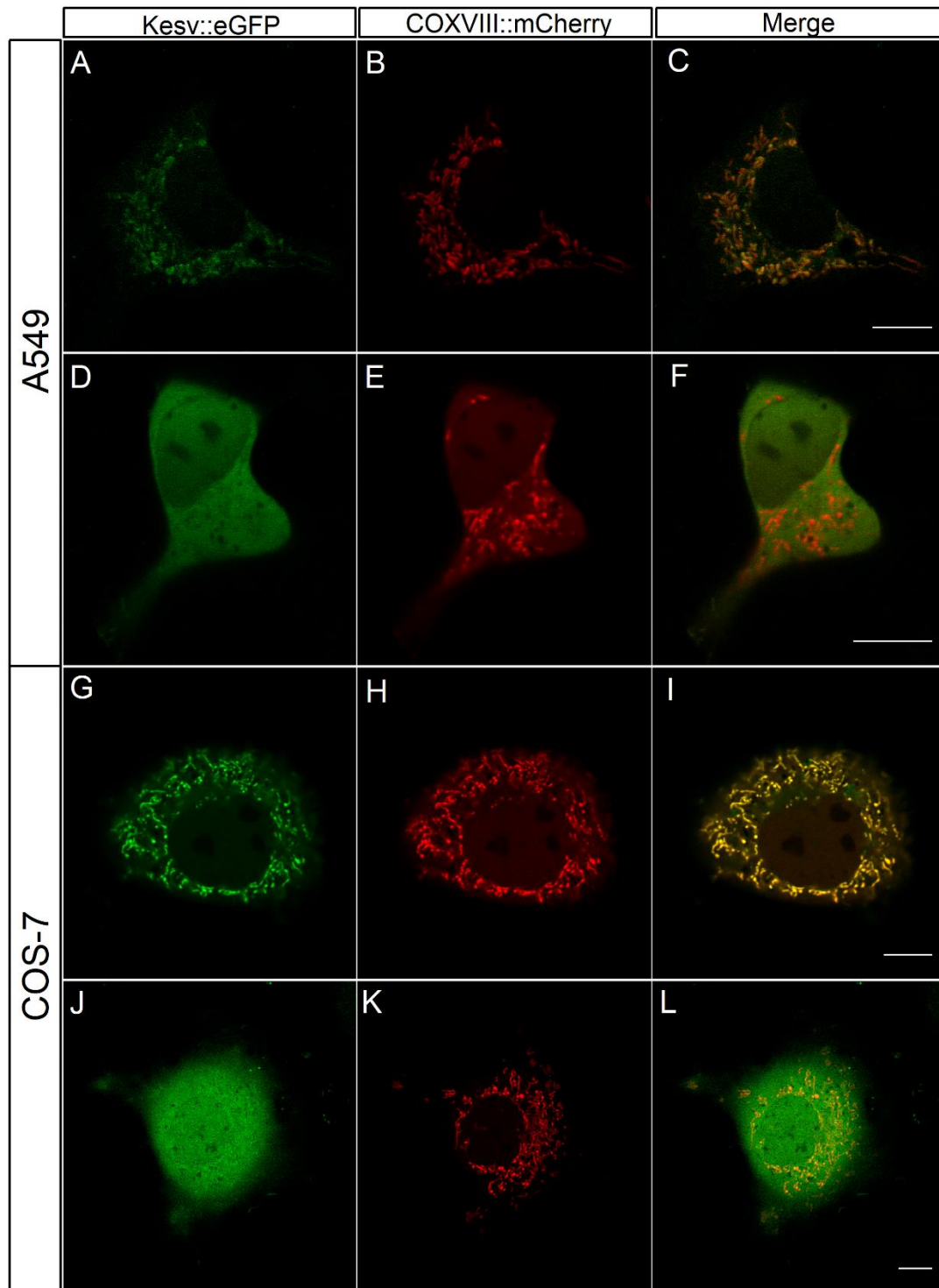


Abbildung 3.2.11: Lokalisation von Kesv::eGFP in A549- und COS-7-Zellen

CLSM-Aufnahmen von A549- und COS-7-Zellen, die mit Kesv::eGFP und COXVIII::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt Kesv::eGFP mitochondrial und (D) unsortiert in A549-Zellen. (B) bzw. (E) zeigen die entsprechenden Zellen mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (C) bzw. (F) das *Overlay* beider Kanäle. (G) zeigt Kesv::eGFP mitochondrial und (J) unsortiert in COS-7-Zellen. (H) bzw. (K) zeigen die entsprechenden Zellen mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (I) bzw. (L) das *Overlay* beider Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 μm .

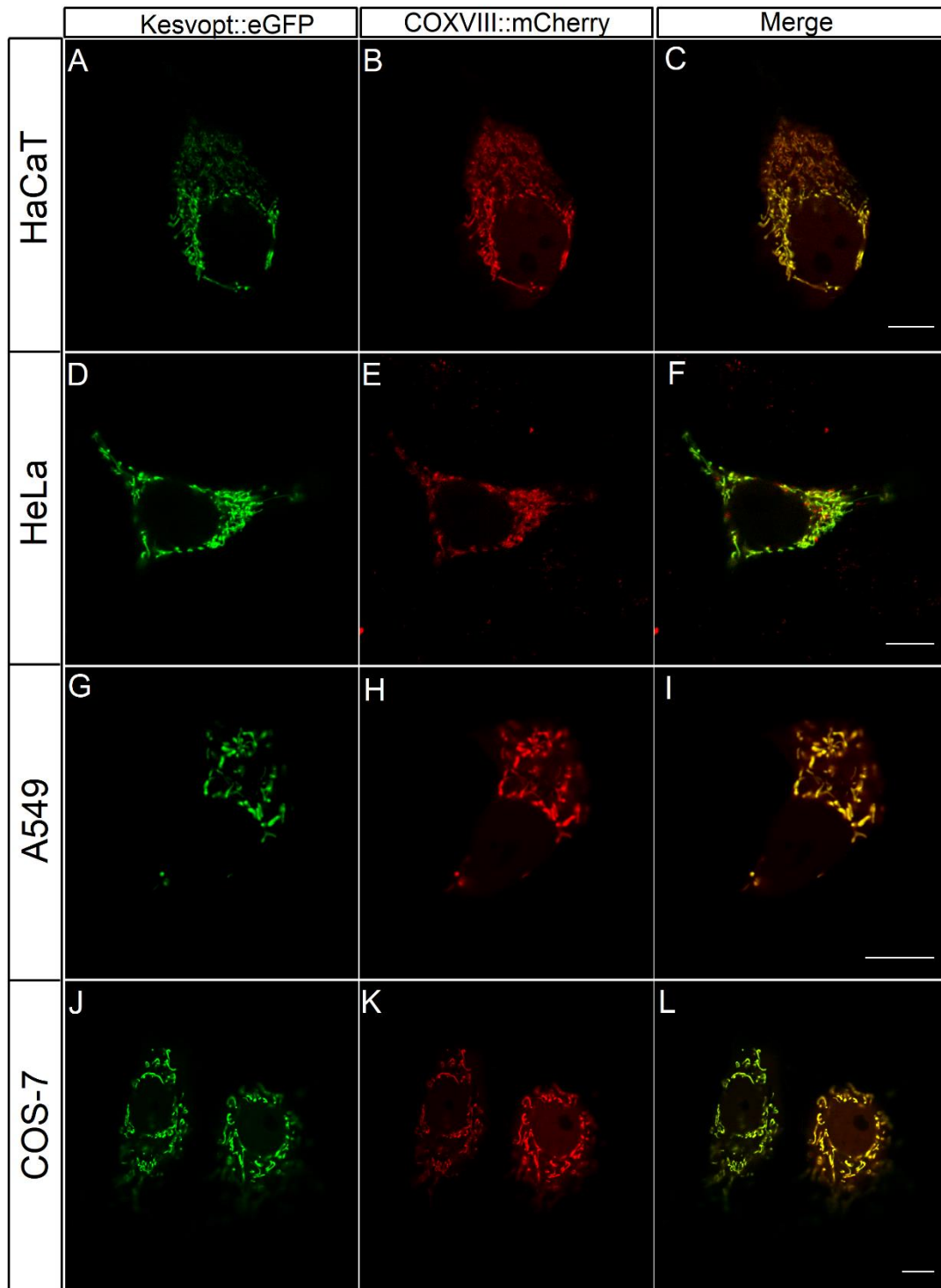


Abbildung 3.2.12: Lokalisation von Kesvopt::eGFP in HaCaT-, HeLa-, A549- und COS-7-Zellen:

CLSM-Aufnahmen verschiedener Zelllinien, die mit Kesvopt::eGFP und COXVIII::mCherry transient co-transfiziert wurden. Kesvopt::eGFP ist in HaCaT- (A), HeLa- (D), A549- (G) und COS-7-Zellen (J) mitochondrial lokalisiert. (B), (E), (H) und (K) zeigen die entsprechenden Zellen mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (C), (F), (I) und (L) das *Overlay* beider Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 μm .

Eine vergleichende Analyse der Daten zeigt, dass Kesv mit einem Anteil von 71 % in HeLa-Zellen am häufigsten in den Mitochondrien lokalisiert ist.

In A549-Zellen zeigen 47 % der Zellen eine mitochondriale Sortierung wohingegen 53 % der Zellen keine klare Sortierung aufweisen. In HaCaT- und COS-7-Zellen überwiegt der Anteil der Zellen, die keine klare Sortierung aufweisen, und mit 12 % (HaCaT) und 6 % (COS-7) ist Kesv nur in wenigen Zellen dieser Zelllinien in den Mitochondrien lokalisiert.

Anders als Kesv, zeigt Kesv_{opt}, keinen Unterschied mehr bei der Sortierungsverteilung in den alternativen Zelllinien.

Wie in **Abbildung 3.2.13** zu sehen, wird Kesv_{opt} in allen betrachteten Zelllinien ausschließlich in die Mitochondrien sortiert.

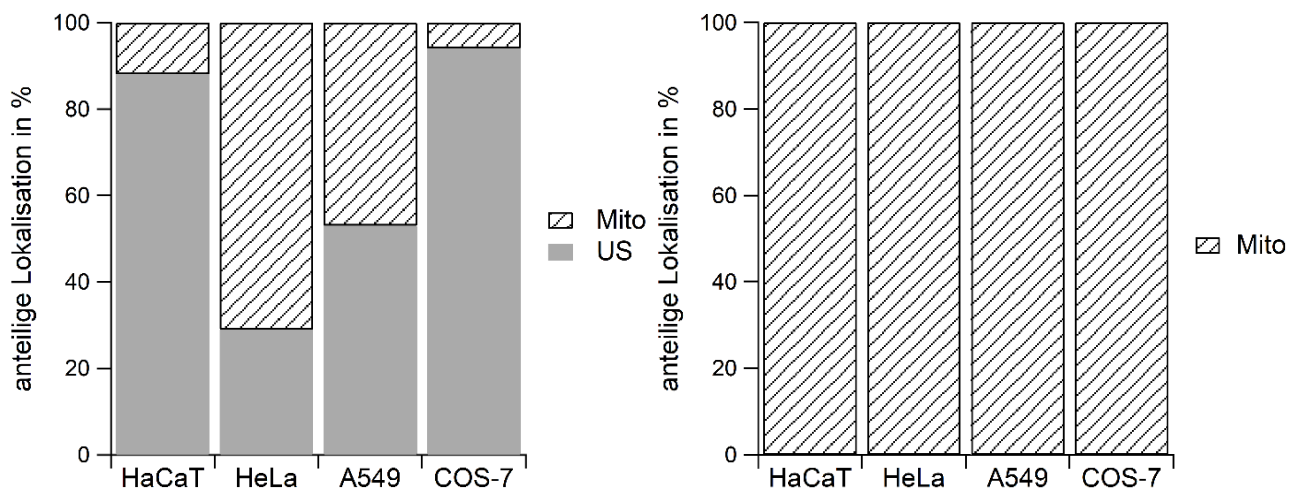


Abbildung 3.2.13: Prozentuale Sortierungsverteilung von Kesv bzw. Kesv_{opt} in verschiedenen Zelltypen

Links: Anteilige Lokalisation in Prozent von Kesv in HaCaT- (n=58), HeLa- (n=110), A549- (n=74) und COS-7-Zellen (n=67) in den Mitochondrien und im Cytosol. **Rechts:** Lokalisation in Prozent von Kesv_{opt} in HaCaT- (n=94), HeLa- (n=169), A549- (n=105) und COS-7-Zellen (n=91) in den Mitochondrien.

Bei der Expression in alternativen Zelllinien zeigt Kesv, anders als in HEK293-Zellen, keinerlei ER-Sortierung.

Bezogen auf den Anteil an mitochondrial-sortiertem Kanalprotein, ähneln HeLa und A549-Zellen den HEK293-Zellen am stärksten.

Bei beiden handelt es sich um aus Karzinomen stammenden Zelllinien: HeLa-Zellen wurden aus einem Cervix-Karzinom und A549-Zellen aus einem Lungen-Karzinom gewonnen.

In HaCaT- und COS-7-Zellen ist eine mitochondriale Sortierung hingegen seltener zu beobachten. Bei HaCaT-Zellen handelt es sich um humane Keratinozyten, wohingegen COS-7 Fibroblasten-ähnliche Zellen der äthiopischen Grünmeerkatze entstammen.

Aus der Auswahl der betrachteten Zelllinien lässt sich keine Regel ableiten, die eine Wahrscheinlichkeit des Proteintransports von Kesv vorhersagt. Da Kesv_{opt} jedoch in allen untersuchten Zelllinien seinen effektiven Transport in die Mitochondrien beibehält, lässt sich konstatieren, dass der Einfluss der Codonoptimierung von Kesv Zelltyp-unabhängig ist. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Proteinsortierung von Kesv inhomogen und Zelltyp-abhängig ist wohingegen die Proteinsortierung von Kesv_{opt} sehr homogen und Zelltyp-unabhängig ist.

3.2.2. Kesv_{deopt}

Um die Frage des Einflusses der Translationseffizienz auf die Proteinsortierung von Kesv ferner zu beleuchten, wurde mit dem synthetischen Kesv_{deopt} ein Gegenentwurf zu Kesv_{opt} geschaffen. Die Basensequenz von Kesv_{deopt} wurde so gewählt, dass ihre Codone maximal deoptimiert für eine Expression in humanen Zellsystemen sind; dabei sollen jedoch keine Motive entstehen, die eine Expression verhindern. Der CAI von Kesv_{deopt} liegt mit 0,61 leicht unter dem von Kesv (CAI= 0,68) und sein GC-Gehalt mit 36 % deutlich unter dem von Kesv (GC-Gehalt= 52 %). Im Vergleich dazu liegt der CAI von Kesv_{opt}, wie in **Abschnitt 3.2.1** beschrieben, bei einem Wert von 0,97 und der GC-Gehalt bei 63 %.

Bei der mikroskopischen Untersuchung zur Sortierung von Kesv_{deopt}::eGFP in HEK293-Zellen zeigt sich Kesv_{deopt} in zwei verschiedenen Ausprägungen (siehe **Abbildung 3.2.14**). Kesv_{deopt} ist entweder in den Mitochondrien lokalisiert (**Abbildung 3.2.14** (A)) oder liegt unsortiert in der Zelle vor ((D) und (G)). Die Zellen, in denen Kesv_{deopt} als unsortiert eingestuft wird, zeigen im Vergleich zu den in **Abbildung 3.1.2** (G) abgebildeten Zellen mit einem unsortierten Kesv auffällige Besonderheiten:

Während das eGFP-Signal im Falle von Kesv eher flächig in der Zelle vorliegt (z. B. **Abbildung 3.1.2** (G)), so weist es im Falle von Kesv_{deopt} deutliche Aussparungen auf. Vergleicht man die Aussparungen des eGFP-Signals mit den Markerproteinen für Mitochondrien (COXVIII::mCherry) und ER (KDEL::mCherry) so liegt das mCherry-Signal zum Teil genau an den Stellen, an denen das flächige eGFP-Signal ein Minimum aufweist. Dieser Eindruck spiegelt sich bei der Betrachtung der in **Abbildung 3.2.15** gezeigten Grauwerte Diagramme entlang eines Linienprofils in (B) und (C) wider. Zeigt das mCherry-Signal von COXVIII (B) und KDEL (C) ein lokales Maximum auf Höhe eines Mitochondriums oder einer ER-Struktur, so sinkt das eGFP-Signal an dieser Stelle meist ab. Der über diesen Bereich ermittelte PCC zwischen Kesv_{deopt}::eGFP und COXVIII::mCherry (PCC=0,25) bzw. KDEL::mCherry (PCC=-0,09) untermauert quantitativ die fehlende Korrelation zwischen Kesv_{deopt}::eGFP und den Markerproteinen.

Im Gegensatz dazu, zeigt die in **Abbildung 3.2.15** (A) gezeigte Zelle, die als mitochondrial sortiert kategorisiert wird, sowohl im Vergleich der Grauwerte verläufe von Kesv_{deopt}::eGFP und

COXVIII::mCherry, als auch durch einen PCC von 0,83, die positive Korrelation zwischen Kesv_{deopt} und dem mitochondrialen Markerprotein.

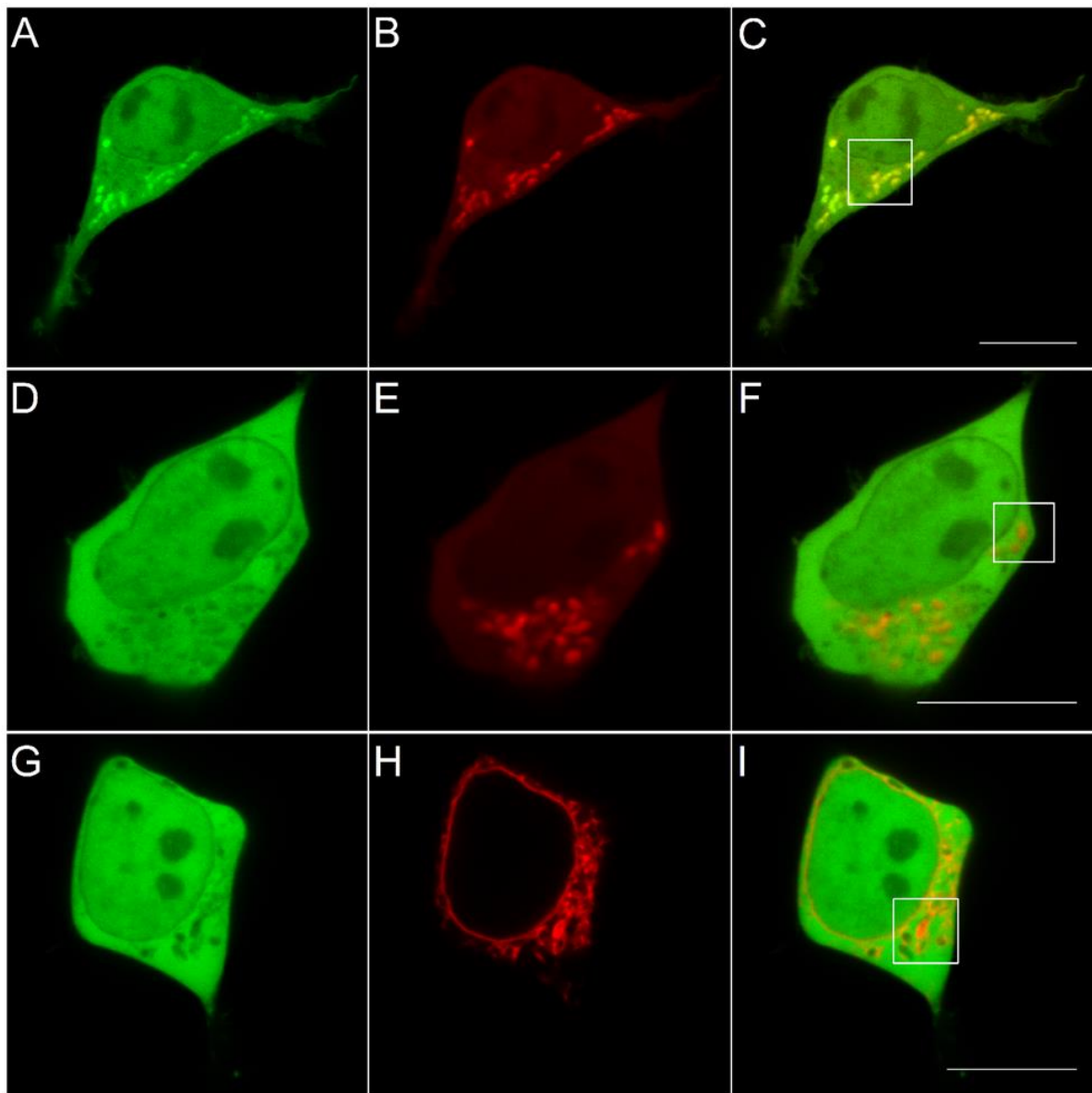


Abbildung 3.2.14: Lokalisation von Kesv_{deopt}

Exemplarische CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die immer mit Kesv_{deopt}::eGFP und entweder mit COXVIII::mCherry oder KDEL::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt den mitochondrial sortierten Kesv_{deopt}::eGFP. (B) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry. (D) und (G) zeigt Kesv_{deopt}::eGFP unsortiert in HEK293-Zellen. (E) und (H) zeigen die entsprechenden Zellen entweder mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry (E) oder KDEL::mCherry (H). (C), (F) und (I) zeigen die jeweiligen *Overlays* der Fluoreszenz-Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 µm. Die Kästen in (C), (F) und (I) markieren den vergrößerten Bereich aus **Abbildung 3.2.15**.

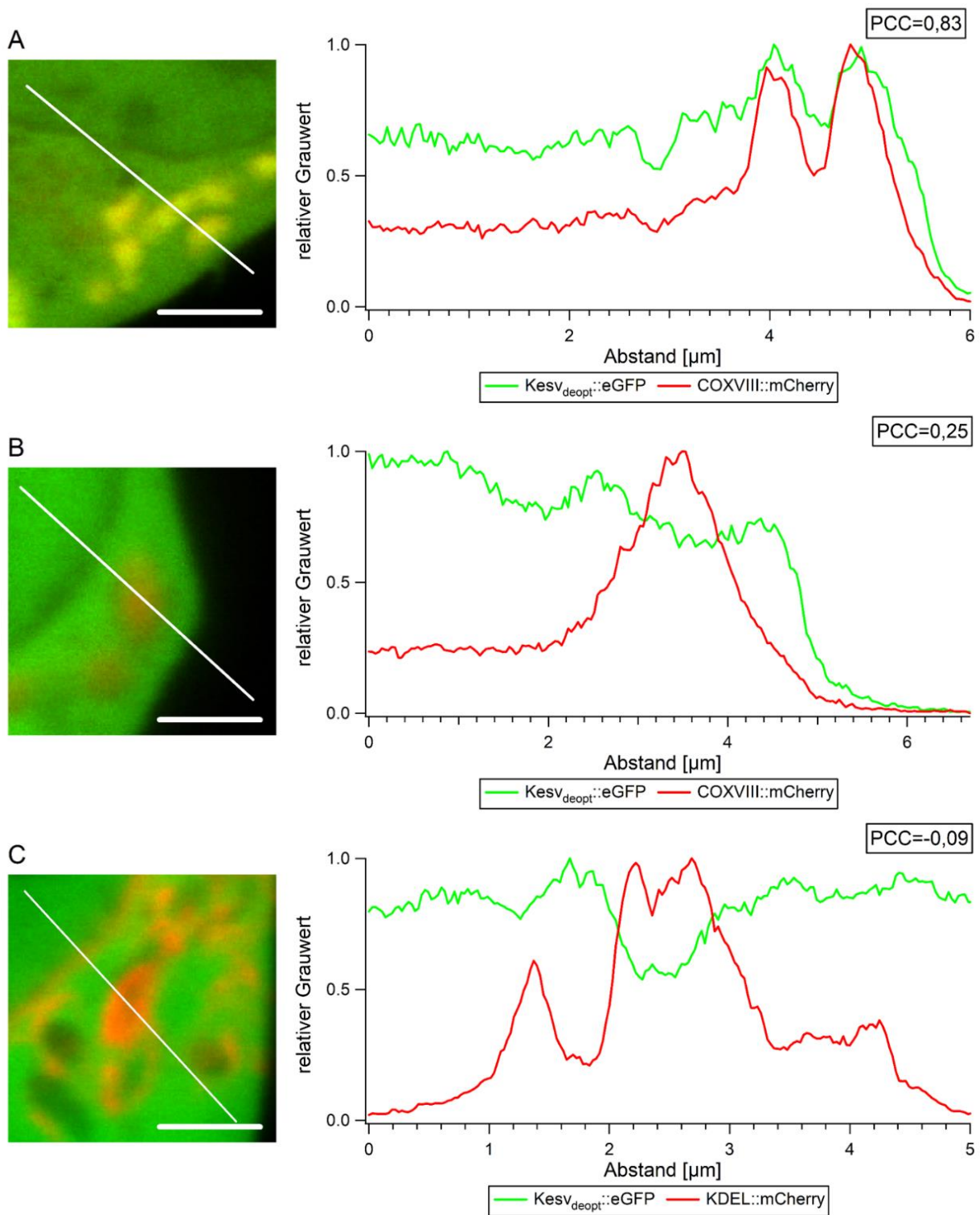


Abbildung 3.2.15: Lokalisationsstudie von Kesv_{deopt}::eGFP mittels Markerproteinen

Vergrößerung der in **Abbildung 3.2.14** (C), (F) und (I) markierten Kästen mit Kesv_{deopt}::eGFP transfizierter HEK293-Zellen. (A) Mitochondrial sortierte Zelle im Vergleich mit COXVIII::mCherry. (B) Unsortierte Zelle im Vergleich mit COXVIII::mCherry. (C) Unsortierte Zelle im Vergleich mit KDEL::mCherry. Der Größenbalken entspricht 2 µm. Die entsprechenden Grauwertverläufe, die in (A), (B) und (C) gezeigten Linienprofile für eGFP (grün) und mCherry (rot) verdeutlichen die positive (A) und negative ((B) und (C)) Korrelation zwischen Kesv_{deopt}::eGFP und dem jeweiligen Markerprotein. Dieser Eindruck wird durch die entsprechenden PCCs validiert.

Die Auszählung von $n=134$ Kesv_{deopt}::eGFP exprimierenden HEK293-Zellen zeigt, dass Kesv_{deopt} mit 82 % hauptsächlich unsortiert und zudem unter Ausschluss von ER und Mitochondrien (siehe **Abbildung 3.2.15**) in der Zelle vorliegt. Nur in 18 % der Fälle kann eine Lokalisation in den Mitochondrien festgestellt werden (siehe **Abbildung 3.2.16**).

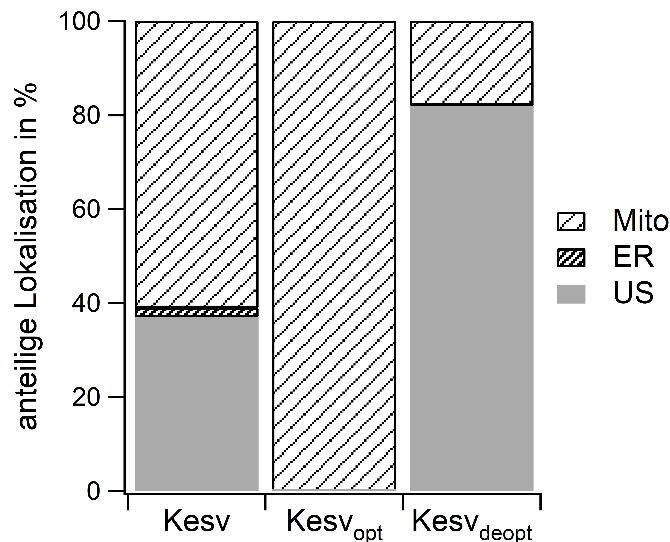


Abbildung 3.2.16: Prozentuale Sortierungsverteilung von Kesv_{deopt} im Vergleich zu Kesv und Kesv_{opt}

Dargestellt ist die anteilige Lokalisation in Prozent von Kesv ($n=259$), Kesv_{opt} ($n=135$) und Kesv_{deopt} ($n=134$) in unsortierter Form, im ER und in den Mitochondrien von HEK293-Zellen.

Die gezielte Deoptimierung der Codone von Kesv hat, wie auch bei der gezielten Optimierung, den Verlust des cotranslationalen ER-Imports zur Folge. Dies ist jedoch im Gegensatz zu Kesv_{opt} nicht durch eine gesteigerte Sortierungseffizienz in die Mitochondrien zu erklären, da Kesv_{deopt} noch seltener in den Mitochondrien lokalisiert ist als Kesv. Im Falle des Kesv_{deopt} kommt es durch die Wahl nicht optimaler Codone wahrscheinlich zu tRNA-limitierten Phasen von verlangsamter Proteinsynthese. Diese können laut Buhr *et al.* (2016) in Fehlfaltungen des Proteins resultieren, die wiederum eine gezielte Proteinsortierung unterbinden. Dies führt zu einer unstrukturierten GFP-Fluoreszenz in einem Großteil der Zellen. Es kann jedoch hier nicht geklärt werden, ob die Hintergrundfluoreszenz durch das vollständige Fusionsprotein oder durch seine Abbauprodukte generiert wird. Die Tatsache, dass in dem Fall die eGFP-Fluoreszenz auch im Zellkern zu sehen ist, lässt jedoch schon an dieser Stelle vermuten, dass es sich hier um Abbauprodukte des Fusionsproteins handeln muss. Es ist nicht anzunehmen, dass das hydrophobe Kanalprotein samt eGFP frei durch die Kernporen diffundieren kann.

Um zu untersuchen, ob die Hintergrundfluoreszenz von Kesv und Kesv_{deopt} in der Tat auf Abbauprodukte des Fusionsproteins zurückzuführen ist, wurde das Ganzzell-Lysat von Kesv::eGFP, Kesv_{opt}::eGFP,

Kesv_{deopt}::eGFP und freies eGFP exprimierenden HEK293-Zellen mittels eines 17,5 % SDS-Gels bei 4 mA über Nacht aufgetrennt. Das Vorkommen von eGFP wurde mittels Westernblots mit einem α -GFP-Antikörper und einem β -Aktin Antikörper als Ladekontrolle dekoriert. β -Aktin dient hier als Ladekontrolle, wobei α -GFP zur Detektion der Kesv::eGFP-Fusionsproteine dient. Die Ladekontrolle β -Aktin läuft auf einer Höhe von ca. 42 kDa und entspricht somit der Proteingröße, die den Herstellerangaben entnommen werden kann (Sigma Aldrich, St. Luis, Missouri, USA). Die gleichmäßige Bandendicke über alle vier aufgetragenen Proben hinweg weist darauf hin, dass bei allen Proben, die annähernd identische Proteinmenge aufgetragen wurde.

Einen unerwarteten Befund liefert hingegen der Bandenverlauf der α -GFP gekoppelten Proteine. Das berechnete Molekulargewicht der Kesv::eGFP-Fusionsproteine liegt bei 37 kDa, da eGFP ein Molekulargewicht von 26 kDa und die Kesv-Varianten je ein Molekulargewicht von 11 kDa haben. Wie in **Abbildung 3.2.17** zu sehen zeigt allerdings keines der aufgetragenen Kesv-eGFP-Fusionsproteine die erwartete Bande bei 37 kDa.

Dies könnte unter anderem zwei Gründe haben:

1. Die Probenaufbereitung führt, trotz des Einsatzes von Protease-Inhibitoren, zu einer Degradation des Fusionsproteins, sodass die Banden Abbauprodukten verschiedener Längen entsprechen. Ist dies der Fall, so ist es dennoch interessant, dass Kesv und Kesv_{opt}, die beide effizienter sortiert werden, neben der Bande des freien eGFP und einer weiteren kleineren Größe noch eine weitere Bande aufweisen, wobei Kesv_{deopt} nur die beiden Banden kleinerer Größe zeigt. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass Kesv_{deopt}::eGFP anders in der Zelle prozessiert wird als Kesv::eGFP und Kesv_{opt}::eGFP und deshalb auch seine unstrukturierte eGFP-Fluoreszenz eine andere Ausprägung hat als die von Kesv::eGFP.
2. Das Fusionsprotein hat seine Sekundär- und Tertiärstruktur nicht vollständig verloren und läuft deshalb nicht auf der Höhe seiner berechneten, linearisierten Form. Wäre dies der Fall, so könnte die Bande bei ca. 33 kDa von Kesv::eGFP und Kesv_{opt}::eGFP dem jeweiligen Fusionsprotein entsprechen. Dies würde im Umkehrschluss bedeuten, dass Kesv_{deopt}::eGFP in der Zelle degradiert wird und kein Fusionsprotein detektiert wird, da hier die obere Bande fehlt. Der mittels CLSM beobachtete Ausschluss des eGFP-Signals verschiedener Organellen in mit Kesv_{deopt} transfizierten HEK293-Zellen könnte darauf zurückzuführen sein, dass Kesv_{deopt} frühzeitig abgespalten wird und das freie eGFP alleine nicht an das ER oder die Mitochondrien dirigiert wird.

Die abschließende Überprüfung der genannten Hypothesen war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

An dieser Stelle ist jedoch auch anzumerken, dass Kcv, ein kleiner viraler Kaliumkanal ist, der in vielen Aspekten Kesv ähnlich ist. Kcv zeigt bei Auftrennung in einem SDS-Gel eine interessante Kationen-selektive Stabilität. Damit verhält sich das Protein nicht im klassischen Sinne; die Oligomerstruktur des Kanals bleibt im SDS-Gel erhalten. So konnten Pagliuca *et al.* (2007) zeigen, dass Kcv lediglich nach Erwärmen auf 95 °C in Abwesenheit von KCl nur als Monomer detektierbar ist. Befindet sich K⁺ oder befinden sich Kationen mit einem größeren Atomradius als K⁺, wie Rb⁺ oder Cs⁺, in der SDS-Pufferlösung, so wird Kcv als Tetramer stabilisiert und zeigt selbst nach Erhitzen auf 95 °C eine erwartete Bande bei 55 kDa (Pagliuca *et al.*, 2007).

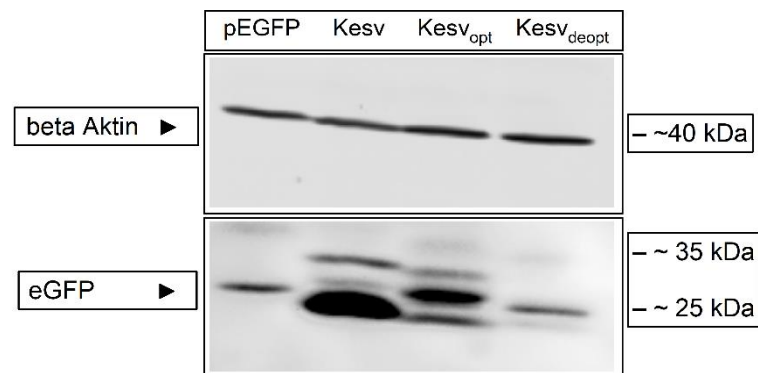


Abbildung 3.2.17: Exemplarischer Banden-Verlauf bei Expression von Kesv, Kesv_{opt} und Kesv_{deopt} im Vergleich zu freiem eGFP

Der Westernblot wurde 24 h nach Transfektion mit pEGFP, Kesv, Kesv_{opt} und Kesv_{deopt} und der darauffolgenden Auftrennung der Proteinmenge von 1x10⁶ Zellen in einem SDS-Gel erstellt. Der Westernblot wurde zum einen mit einem α-β-Aktin und zum anderen mit einem α-GFP-Antikörper dekoriert. β-Aktin wurde mittels eines Cy3 gekoppelten und GFP mittels eines HR-gekoppelten Antikörpers detektiert. Zur Ermittlung der Proteingröße wurde ein Marker zwischen 10 und 180 kDa (PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) mitgeführt.

Als Ergebnis dieser Experimente kann man festhalten, dass die gezielte Codon-Deoptimierung von Kesv die Sortierung des Proteins moduliert und vor allem die Sortierungseffizienz von Kesv deutlich beeinflusst. Kommt es bei Kesv_{opt} zu einem effizienteren Import in die Mitochondrien, so nimmt die mitochondriale Sortierung bei Kesv_{deopt} im Vergleich zum Wildtyp Kesv stark ab. Die zu Beginn formulierte Hypothese, dass die gezielte Änderung der Codone bezüglich ihres CAI und die damit einhergehende Veränderung der Translationseffizienz das *targeting* von Kesv moduliert (siehe 3.2), kann aufgrund der gezeigten Ergebnisse als wahrscheinlich gelten.

3.2.3. Kesv_{random}

Um ausschließen zu können, dass die Modulation des *targetings* von Kesv durch die gezielte Veränderung der Codone, auf einen unspezifischen Effekt der synthetisch erstellten Fusionsproteine zurückzuführen

ist, wurde eine weitere synthetische Kesv-Variante erstellt. Die Gen-Sequenz von Kesv_{random} wurde dazu nach dem Zufallsprinzip generiert, wobei bei der Codon-Auswahl lediglich darauf geachtet wurde, dass keine repetitiven Sequenzen entstehen. Kesv_{random} dient als Gegenexperiment zu Kesv_{opt} und Kesv_{deopt}, da die Codon-Auswahl nicht gezielt sondern zufällig stattfand. Der CAI und der GC-Gehalt von Kesv_{random} ähneln mit CAI=0.63 und GC-Gehalt=49 % dem von Kesv (CAI=0,68; GC-Gehalt=52 %).

In **Abbildung 3.2.18** soll der Verlauf der Codone über die Länge der Gensequenz und deren relative Häufigkeit in *Homo sapiens* verdeutlicht werden. Der Kurvenverlauf wurde dafür über den %MinMax-Algorithmus bestimmt, der berechnet ob eine Gensequenz für die Kodierung ihrer Aminosäuresequenz häufig oder weniger häufig genutzte Codone verwendet (Clarke IV & Clark, 2008). Diese Ergebnisse werden als fortlaufender Mittelwert über ein Betrachtungsfenster von 18 Codonen gemittelt, weswegen man keine expliziten Aussagen zu lokalen Translationsraten machen darf (Clarke IV & Clark, 2008). Zudem wird aufgrund des Betrachtungsfensters keine Voraussage über den Verlauf der letzten 18 Aminosäuren getroffen. **Abbildung 3.2.18** zeigt, dass die *codon usage* entlang der Gen-Sequenz (Codon 1 bis 107) von Kesv_{random} (grün) wie der von Kesv (rot) mittig zwischen dem von Kesv_{opt} (schwarz gestrichelt) und Kesv_{deopt} (schwarz) verläuft ohne völlig deckungsgleich zu sein. Mit Kesv_{random} wurde somit eine wildtypähnliche jedoch synthetische Kesv-Variante erstellt.

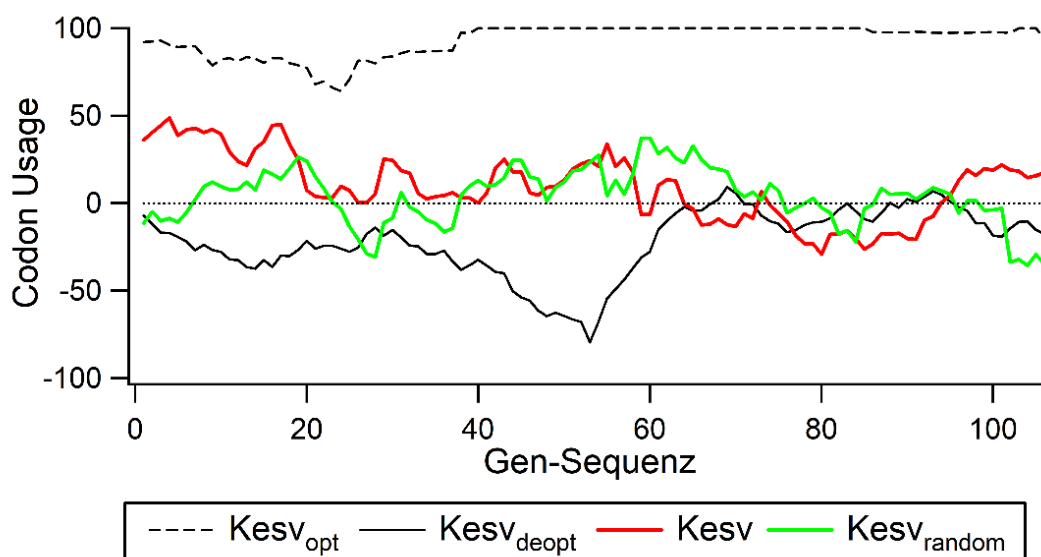


Abbildung 3.2.18: Verlauf der *codon usage* entlang der Gen-Sequenz von Kesv, Kesv_{opt}, Kesv_{deopt} und Kesv_{random}

Der Kurvenverlauf der *codon usage* entlang der Gen-Sequenz spiegelt die natürliche, randomisierte und gezielte Auswahl der Codone von Kesv, Kesv_{random}, Kesv_{opt} und Kesv_{deopt} wider.

Die Lokalisation von Kesv_{random} weist bei der mikroskopischen Primärbetrachtung drei verschiedene Ausprägungen auf. **Abbildung 3.2.19** (A) zeigt exemplarisch eine HEK293-Zelle, bei der

Kesv_{random}::eGFP mitochondrial sortiert ist. Das eGFP-Signal akkumuliert in den Mitochondrien und ist durch eine hohe Deckungsgleichheit mit COXVIII::mCherry (B) gekennzeichnet.

Die in **Abbildung 3.2.19** (D) gezeigte HEK293-Zelle zeigt Kesv_{random} in seiner ER-sortierten Ausprägung, da das eGFP-Signal kongruent zum mCherry-Signal (F) des ER-Markerproteins KDEL::mCherry (E) ist. In **Abbildung 3.2.19** (G) liegt Kesv_{random} unsortiert in der Zelle vor, wodurch es zu einer unspezifischen Überlagerung (I) mit dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry (H) kommt.

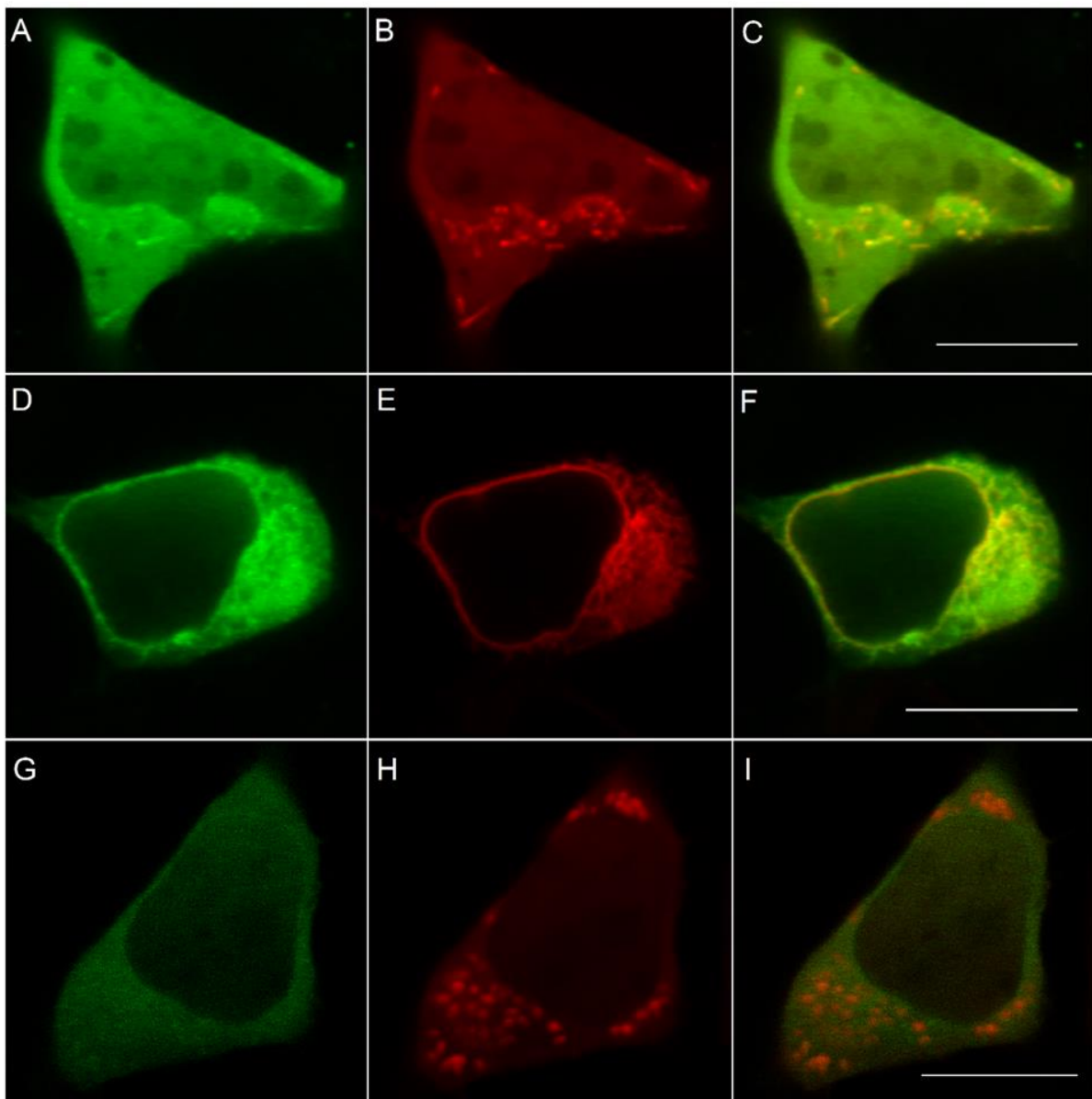


Abbildung 3.2.19: Lokalisation von Kesv_{random}::eGFP

CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit Kesv_{random}::eGFP und entweder mit COXVIII::mCherry oder KDEL::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt Kesv_{random}::eGFP mitochondrial und (G) unsortiert. (B) bzw. (H) zeigen die entsprechenden Zellen mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (C) bzw. (I) das *Overlay* beider Kanäle. (D) zeigt Kesv_{random}::eGFP ER sortiert, (E) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein KDEL::mCherry und (F) das *Overlay* beider Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 μ m.

Die Auszählung von $n=120$ mit Kesv_{random} transfizierten HEK293-Zellen ergibt eine anteilige Lokalisation von Kesv_{random}::eGFP von 8 % in den Mitochondrien, von 13 % im ER und von 79 % im Cytosol.

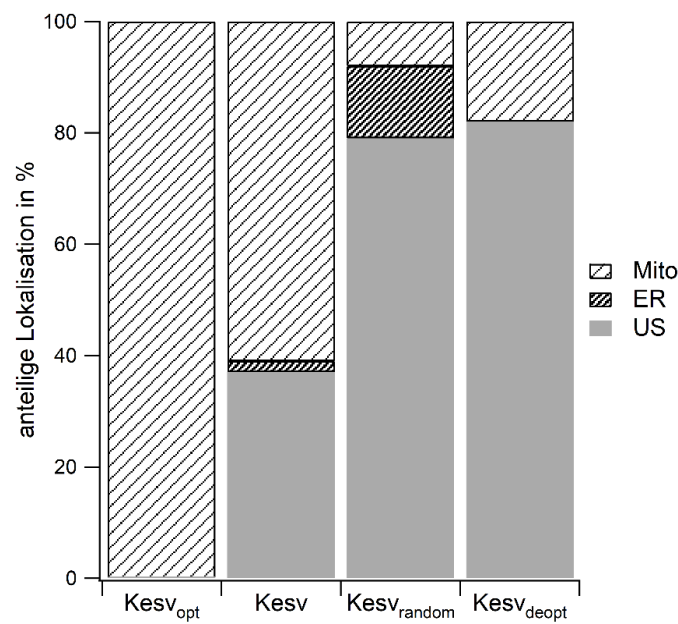


Abbildung 3.2.20: Prozentuale Sortierungsverteilung von Kesv_{random} im Vergleich zu Kesv, Kesv_{opt} und Kesv_{deopt}

Dargestellt ist die anteilige Lokalisation in Prozent von Kesv (n=259), Kesv_{opt} (n=135), Kesv_{deopt} (n=134) und Kesv_{random} (n=120) in unsortierter Form, im ER und in den Mitochondrien von HEK293-Zellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die zufällige Veränderung der Codone von Kesv, im Gegensatz zu ihrer gezielten Änderung, nicht den Verlust des dualen *targeting* von Kesv zur Folge hat. Die Sortierungseffizienz nimmt im Vergleich zum Wildtyp Kesv ab, da nur noch 21 % der Zellen einem spezifischen Kompartiment zugeordnet werden können; jedoch bleiben alle Lokalisations-Ausprägungen von Kesv vorhanden. Die gezielte Optimierung oder Deoptimierung über die gesamte Gen-Sequenz entscheidet über den effizienten oder weniger effizienten posttranslationalen Transport in die Mitochondrien, wobei ein cotranslationaler ER-Transport ausbleibt. Dieser Befund spricht dafür, dass der posttranslationale ER-Transport eine Variation der Translationseffizienz über die Länge des Proteins benötigt.

3.3. Kesv-Kesv_{opt}-Chimären

3.3.1. Einführung zur Struktur der Chimären Kesv₁ bis Kesv₆

Die bisherigen Befunde haben gezeigt, dass die Sortierung von Kesv durch die Codonoptimierung beeinflusst werden kann. Die höchst effiziente Sortierung in die Mitochondrien von Kesv_{opt} ist auf die gezielte Optimierung der Codone und nicht auf die Modifikation der Gensequenz selbst zurückzuführen, da Kesv_{random} trotz zufallsbasierter Modifikation der Gensequenz dieselben Sortierungspopulationen aufweist wie Kesv. Balss *et al.* konnten bereits 2008 in Hefekomplementationstests und in Lokalisationsstudien in HEK293-Zellen zeigen, dass die Einführung zwei bzw. drei Valine an der Stelle 113 zu einer Umsortierung des Kanals an die Plasmamembran führt. Es wurde postuliert, dass das mitochondriale *targeting*-Signal durch ein dreidimensionales Motiv bestimmt wird, welches durch die Insertion gestört wird. Deswegen kann das nächste Sortierungs-Signal in der Signalthierarchie greifen und der sekretorische Transportweg wird eingeschlagen (Balss *et al.*, 2008). Diese Umsortierung ist jedoch in Hefen nicht von der Art der eingefügten Aminosäure abhängig. Im Folgenden sollte deshalb untersucht werden, ob und welchen Einfluss die partielle Codonoptimierung der Gensequenz von Kesv im Bereich der TM2 hat.

Mittels Chimären-PCR wurden sechs Chimären (Kesv₁-Kesv₆) erstellt, die zu unterschiedlichen Anteilen aus Kesv und Kesv_{opt} bestehen (siehe **Abbildung 3.3.1**).

Um den Effekt zu untersuchen, den eine direkte Beschleunigung (Kesv₁) bzw. Entschleunigung (Kesv₂) der Translationsrate, in Relation zur vorangegangenen Translationsrate, in der Umgebung der einflussreichen Stelle 113 hat, wurden die Chimären Kesv₁ und Kesv₂ hergestellt:

- Chimäre Kesv₁ – AS 1-91 Kesv / AS 92-124 Kesv_{opt}
- Chimäre Kesv₂ – AS 1-91 Kesv_{opt} / AS 92-124 Kesv

Um den Effekt zu untersuchen, den eine längere und früher einsetzende (Kesv₃) Verlangsamung der Translationsrate im Vergleich zu einer direkt vor AS113 liegenden jedoch kürzeren Verlangsamung (Kesv₄) auf die Sortierung hat, wurden die Chimären Kesv₃ und Kesv₄ erstellt:

- Chimäre Kesv₃ – AS 1-48 Kesv_{opt} / AS 49-91 Kesv / AS 92-124 Kesv_{opt}
- Chimäre Kesv₄ – AS 1-91 Kesv_{opt} / AS 92-109 Kesv / AS 110-124 Kesv_{opt}

Um den Effekt zu untersuchen, den eine Veränderung der Translationsrate kurz vor Abschluss der Translation auf die Sortierung hat, wurden die Chimären Kesv₅ und Kesv₆ generiert:

- Chimäre Kesv₅ – AS 1-109 Kesv_{opt} / AS 110-124 Kesv
- Chimäre Kesv₆ – AS 1-109 Kesv / AS 110-124 Kesv_{opt}

Kesv₆ ist also dementsprechend die Chimäre mit dem größten Anteil von Kesv.

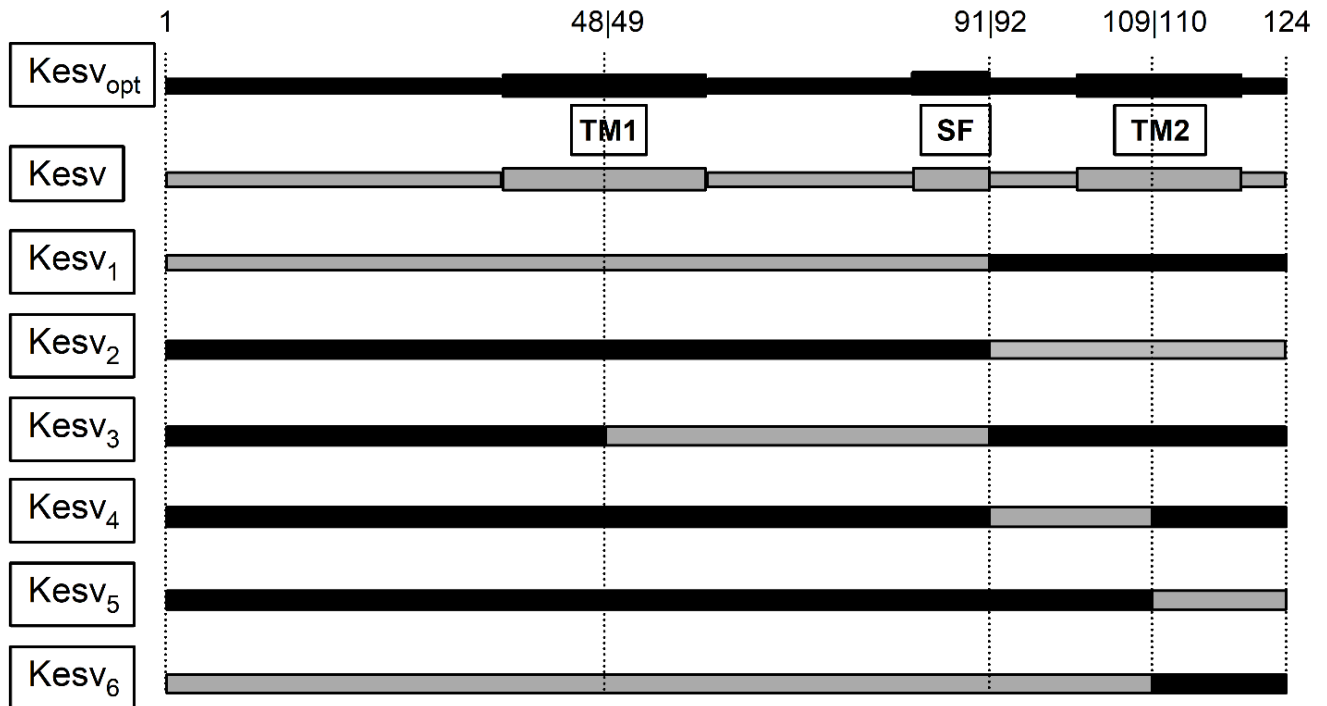


Abbildung 3.3.1: Schema zur Zusammensetzung der Kesv-Kesv_{opt}-Chimären

Es wurden sechs Chimären mit unterschiedlichen Anteilen aus Kesv und Kesv_{opt} hergestellt und deren Zusammensetzung hier schematisch dargestellt. Die schwarzen Anteile stammen der Gen-Sequenz des Kesv_{opt} ab und die grauen Anteile aus der Gen-Sequenz von Kesv. Die Stelle des Wechsels in der Aminosäure-Sequenz ist durch die gestrichelten Linien und den Zahlenangaben im oberen Bereich gezeigt. Die Chimären Kesv₁, Kesv₂, Kesv₅ und Kesv₆ haben jeweils nur einen Kanalwechsel. So liegt der Kanalsequenzübergang bei Kesv₁ und Kesv₂ zwischen Aminosäure 91/92 und bei Kesv₅ und Kesv₆ zwischen Aminosäure 109/110. Die Chimären Kesv₃ und Kesv₄ haben zwei Kanalsequenzübergänge. Kesv₃ wechselt zwischen Aminosäure 48 und 49 von Kesv_{opt} zu Kesv und an der Stelle 91/92 wieder zu Kesv_{opt} zurück. Kesv₄ wechselt bei Aminosäure 91 von Kesv_{opt} auf Kesv und an Stelle 109 wieder zu Kesv_{opt} zurück.

Das folgende Schema soll einen Eindruck über den Verlauf der *codon usage* der Kesv-Kesv_{opt}-Chimären vermitteln (siehe **Abbildung 3.3.2**). Der Kurvenverlauf wurde wie in 3.2.3 erstellt und zeigt den Verlauf der *codon usage* der Chimären Kesv₁-Kesv₆ von Aminosäure 1 bis Aminosäure 106. Der Kurvenverlauf ist im Vergleich zu den eigentlichen Übergängen der Gensequenzen verschoben, was auf das Betrachtungsfenster von 18 Aminosäuren zurückzuführen ist. Dies ist jedoch nicht als Nachteil dieser Darstellungsmöglichkeit zu werten, sondern gibt vielmehr eine bessere Einschätzung darüber wie die Chimären am Ribosom translatiert werden, da die Translationsrate multifaktoriell beeinflussbar ist und daher die Codon-Umgebung aussagekräftiger ist als die Translationsrate eines einzelnen Codons.

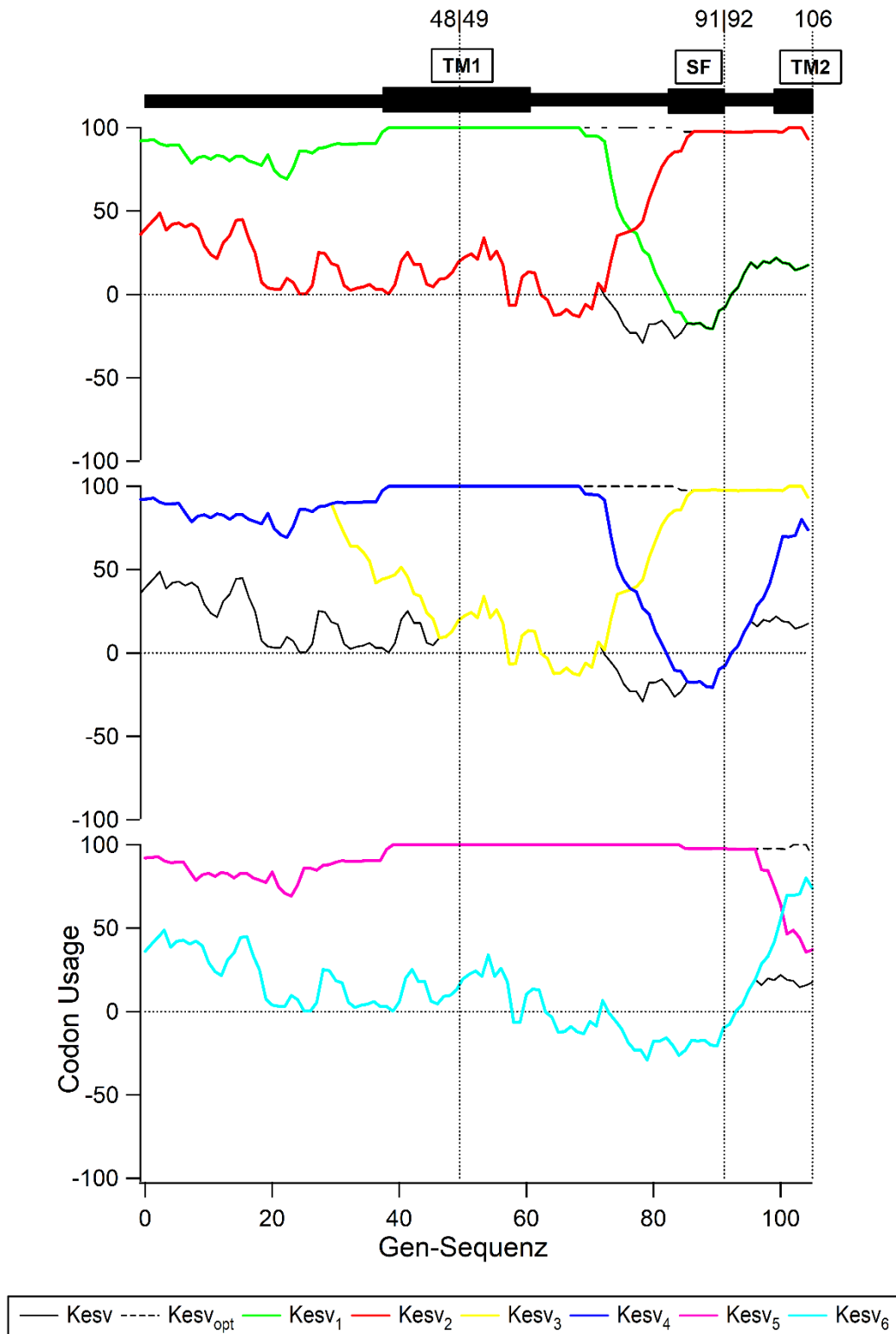


Abbildung 3.3.2: Verlauf der *codon usage* entlang der Gen-Sequenz von Kesv₁ und Kesv₂, Kesv₃ und Kesv₄, Kesv₅ und Kesv₆ im paarweisen Vergleich

Der Kurvenverlauf zeigt die *codon usage* entlang der Gen-Sequenz der verschiedenen Chimären im paarweisen Vergleich. Durch das Betrachtungsfenster von 18 AS endet der Verlauf bei AS 106 und somit im Fall von Kesv₅ und Kesv₆, sowie Kesv₄ noch vor dem eigentlichen Kanalwechsel an AS 109. Die Darstellung vermittelt einen Eindruck, über den Effekt auf den *codon usage*-Verlauf, durch die Wechsel zwischen der Kesv und Kesv_{opt} Gen-Sequenz bei den einzelnen Chimären.

3.3.2. Einführung und erweiterte Analyse der Kategorie „Mito+ER“

An dieser Stelle muss ein Einschub gemacht werden, da mit Erstellung der Kesv-Kesv_{opt}-Chimären Kesv₁ und Kesv₄ sowie mit Betrachtung der Chimäre Kesv_{30/50opt} (siehe **Abschnitt 3.3.4**) erstmals eine neue, ungewöhnliche Struktur des eGFP-Signals beobachtet werden kann. Die Signal-Verteilung war keiner der bis dato bekannten Kategorien „Mito“, „ER“ oder „unsortiert“ zuzuordnen, da innerhalb einer einzelnen Zelle sowohl punktförmige und tubuläre Strukturen, als auch netzartige Strukturen, die den Zellkern als perinukleären Ring umschließen, auszumachen sind. Über Lokalisationsstudien mittels der Markerproteine COXVIII::mCherry (Mitochondrien) und KDEL::mCherry (ER) konnten zum einen die punktuellen Strukturen als Mitochondrien (**Abbildung 3.3.3**), zum anderen die netzartigen Strukturen als ER (**Abbildung 3.3.4**) identifiziert werden, weswegen im Weiteren diese Kategorie als „Mito+ER“ benannt wurde. **Abbildung 3.3.3** zeigt exemplarisch den Vergleich einer Zelle mit der beschriebenen Doppeltlokalisierung von Kesv₁::eGFP mit dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry. Der auf den jeweils höchsten Wert normierte Grauwerteverlauf über das gezeigte Linienprofil zeigt deutlich, dass die Signalmaxima und -minima des eGFP-Signals und des mCherry-Signals bei den untersuchten punktuellen Strukturen lokal zusammenfallen. Zudem unterstützt auch der über den vergrößerten Bereich ermittelte PCC von 0,97 quantitativ eine robuste Kolo-kalisation mit den Mitochondrien. Die Ermittlung des PCC bei n=10 Zellen über die gesamte Zellfläche in Relation zum mitochondrialen Markerprotein ergibt einen PCC von $0,81 \pm 0,13$.

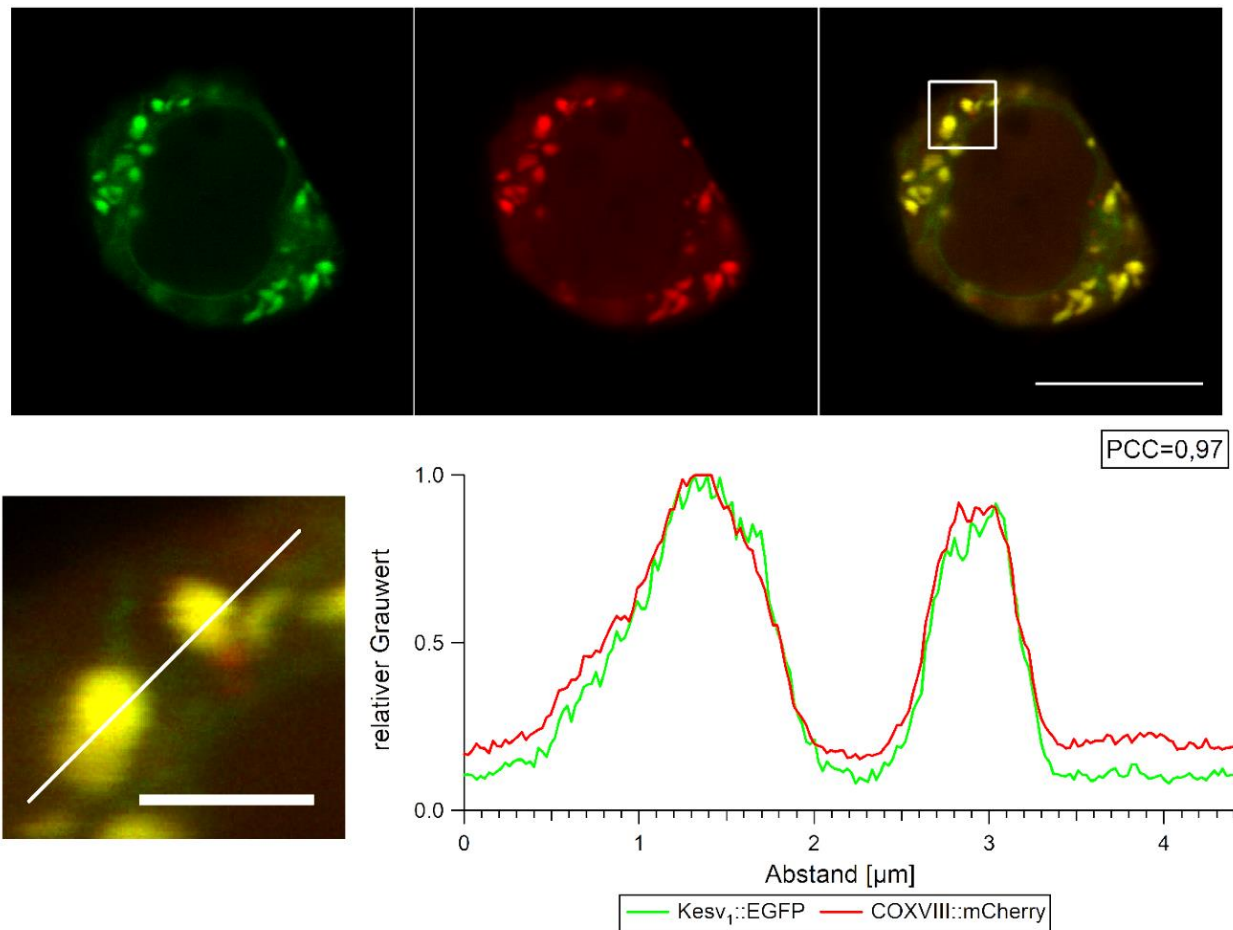


Abbildung 3.3.3: Lokalisationsstudie der Kategorie „Mito+ER“ mittels des mitochondrialen Markerproteins COXVIII::mCherry

Vergrößerung des markierten Kastens von einer mit Kesv1::eGFP und COXVIII::mCherry co-transfizierten HEK293-Zelle. Der entsprechende Grauwertverlauf, des gezeigten Linienprofils für eGFP (grün) und mCherry (rot) verdeutlicht die positive Korrelation zwischen Kesv1::eGFP und dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry. Dieser Eindruck wird durch den hohen positiven PCC validiert. Der Größenbalken, der Vergrößerung entspricht 2 μm , der Größenbalken entspricht 10 μm .

In **Abbildung 3.3.4** ist der Vergleich einer Kesv1 exprimierenden Zelle aus der Sortierungspopulation „Mito+ER“ mit dem ER-ständigen Markerprotein KDEL::mCherry zu sehen.

Neben der netzartigen, den Zellkern umschließenden Struktur, die starke Deckungsgleichheit mit dem ER-Markerprotein aufweist, sind auch hier deutlich punktuelle Akkumulationen des eGFP-Signals zu erkennen. Diese können aufgrund der Analyse der Zelle in **Abbildung 3.3.3** mit höchster Wahrscheinlichkeit auch hier als Mitochondrien eingeordnet werden. Die netzartigen Strukturen, die auch einen perinukleären Ring bilden, lassen sich über ihre hohe Deckungsgleichheit mit dem Markerprotein KDEL::mCherry als ER identifizieren. Dieser visuelle Eindruck bestätigt sich zum einen über den Grauwertverlauf der beiden Fluoreszenzsignale, deren Signalmaxima und -minima sehr ähnlich verlaufen, und zum anderen über einen PCC der mit 0,62 deutlich über dem Kolokalisations-

Schwellenwert von 0,4 liegt. Diese positive Korrelation der beiden Signale zeigt sich auch im mittleren PCC von $n=10$ Zellen von $0,63 \pm 1,6$, der über den gesamten Zellbereich ermittelt wurde.

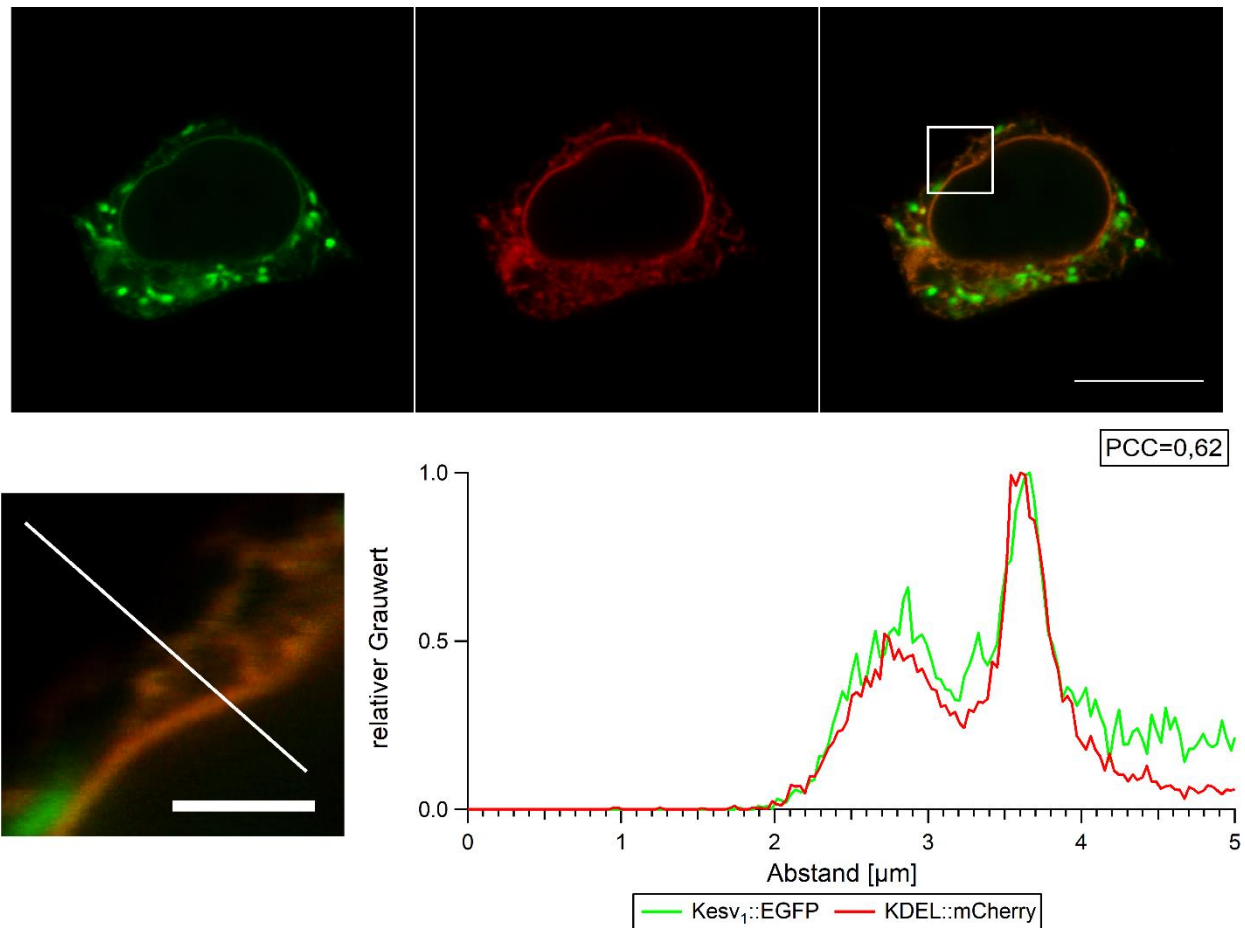


Abbildung 3.3.4: Lokalisationsstudie der Kategorie „Mito+ER“ mittels des ER-ständigen Markerproteins KDEL::mCherry

Vergrößerung des markierten Kastens von einer mit KESV1::eGFP und KDEL::mCherry co-transfizierten HEK293-Zelle. Der entsprechende Grauwertverlauf, des gezeigten Linienprofils für eGFP (grün) und mCherry (rot) verdeutlicht die positive Korrelation zwischen KESV1::eGFP und dem ER Markerprotein KDEL::mCherry. Dieser Eindruck wird durch den hohen positiven PCC validiert. Der Größenbalken der Vergrößerung entspricht 2 μm , der Größenbalken entspricht 10 μm .

Aufgrund dieser Lokalisationsstudien werden alle Zellen, die sowohl punktuelle als auch netzartige Strukturen und vor allem zusätzlich auch einen klar zu erkennenden perinukleären Ring aufweisen, in die neu definierte Kategorie „Mito+ER“ eingeordnet.

3.3.3. Untersuchung der Sortierungsverteilung der Chimären Kesv₁ bis Kesv₆

Im Folgenden werden die Ergebnisse der mikroskopischen Primärbetrachtung der sechs Kesv-Kesv_{opt}-Chimären näher besprochen und die verschiedenen Sortierungspopulationen, die die jeweilige Chimären aufweisen, im Vergleich mit den Markerproteinen COXVIII::mCherry (mitochondrial) und KDEL::mCherry (ER) dargestellt.

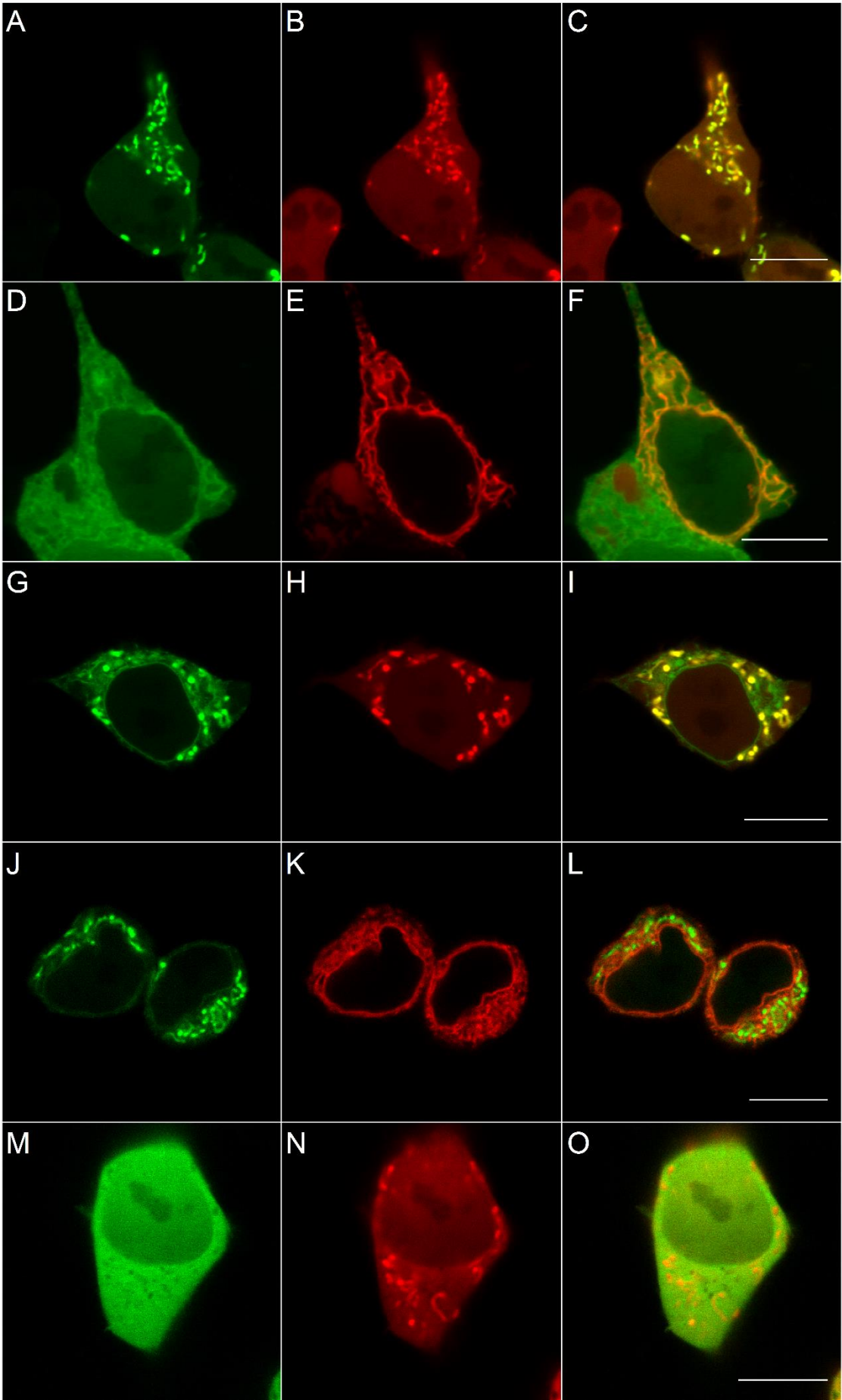
Die Chimäre Kesv₁ zeigt sich, wie **Abbildung 3.3.5** zu entnehmen ist, in vier verschiedenen Ausprägungen der Sortierung. Teil (A) der Abbildung zeigt beispielhaft eine Zelle, in der Kesv₁::eGFP in punktuellen Strukturen akkumuliert vorliegt. Der Vergleich mit dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry (B) beweist, dass es sich hierbei um Mitochondrien handelt, da das *Overlay* (C) der beiden Fluoreszenzsignale eine Kolokalisation bestätigt.

Neben einer mitochondrialen Sortierung zeigt sich Kesv₁ auch ER-sortiert. Das eGFP-Signal zeichnet den perinukleären Ring nach und zeigt sich in netzartigen Strukturen. Die in (D) gezeigte Zelle steht exemplarisch für diese Population von Kesv₁::eGFP exprimierende HEK293-Zellen und die Kolokalisation mit dem ER ständigen Markerprotein KDEL::mCherry (E) bestätigt die Akkumulation von Kesv₁ im ER. Die in **Abbildung 3.3.5** (M) gezeigte Zelle lässt keine gezielte Sortierung erkennen und wurde daher als unsortiert kategorisiert. Das eGFP-Signal (M) liegt flächig mit einigen kleineren Aussparungen und unter Ausschluss des Zellkerns in der Zelle vor. Der Vergleich mit dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry lässt darauf schließen, dass die kleineren punktuellen Aussparungen des eGFP-Signals nur teilweise mit den Mitochondrien zusammenfallen und diese somit nur teilweise erklären.

Die unter (G) und (J) dargestellte Sortierungsausprägung von Kesv₁ zeigt einen bis zu diesem Zeitpunkt erstmalig gemachten außerordentlichen Befund. Kesv₁ liegt hier in ein und derselben Zelle sowohl in punktuellen als auch in netzartigen Strukturen vor, die zudem den Zellkern als perinukleären Ring umschließen. Der Vergleich mit den ER (K) und Mitochondrien (H) spezifischen Markerproteinen identifiziert die punktuellen Strukturen als Mitochondrien und die netzartigen als ER. An dieser Stelle ist anzumerken, dass eine Untersuchung dieser Population immer nur mit einem Markerprotein stattgefunden hat. Die Kriterien zur Einordnung in diese Kategorie und eine ausführlichere Analyse dieser Sortierungsausprägung ist unter Abschnitt 3.3.2. zu finden.

Abbildung 3.3.5 auf der folgenden Seite: Lokalisation von Kesv₁::eGFP

CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit Kesv₁::eGFP und entweder mit COXVIII::mCherry oder KDEL::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt Kesv₁::eGFP mitochondrial und (M) unsortiert. (B) bzw. (N) zeigen die entsprechenden Zellen mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (C) bzw. (O) das *Overlay* beider Kanäle. (D) zeigt Kesv₁::eGFP ER sortiert, (E) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein KDEL::mCherry und (F) das *Overlay* beider Kanäle. (G) bzw. (J) zeigt Kesv₁::eGFP sowohl in Mitochondrien und ER in derselben Zelle lokalisiert. (H) zeigt die entsprechende Zelle aus (G) mit dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry und (K) die entsprechende Zelle aus (J) mit dem ER-Markerprotein KDEL::mCherry. (I) und (L) zeigen die entsprechenden *Overlays* der beiden Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.



Kesv₂::eGFP zeigt sich bei der mikroskopischen Primärbetrachtung in drei verschiedenen Ausprägungen. Wie **Abbildung 3.3.6** (A) zu entnehmen, zeigt eine Population der Zellen eine Akkumulation des eGFP-Signals in den Mitochondrien. Das Kesv₂::eGFP Signal der in (A) exemplarisch dargestellten Zelle kolokalisiert mit dem mCherry Signal (B) des mitochondrialen Markerproteins COXVIII::mCherry, wie dem *Overlay* (C) der beiden Kanäle zu entnehmen ist. Die zweite Population an HEK293-Zellen zeigt eine Sortierung von Kesv₂::eGFP (D) in das ER und somit eine starke Kongruenz mit dem ER-Markerprotein KDEL::mCherry (E). Die letzte Population lässt keine gezielte Sortierung erkennen und weist daher ein flächiges eGFP-Signal (G) auf, das im Vergleich zu dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry (H) keine Strukturen aufzeigt.

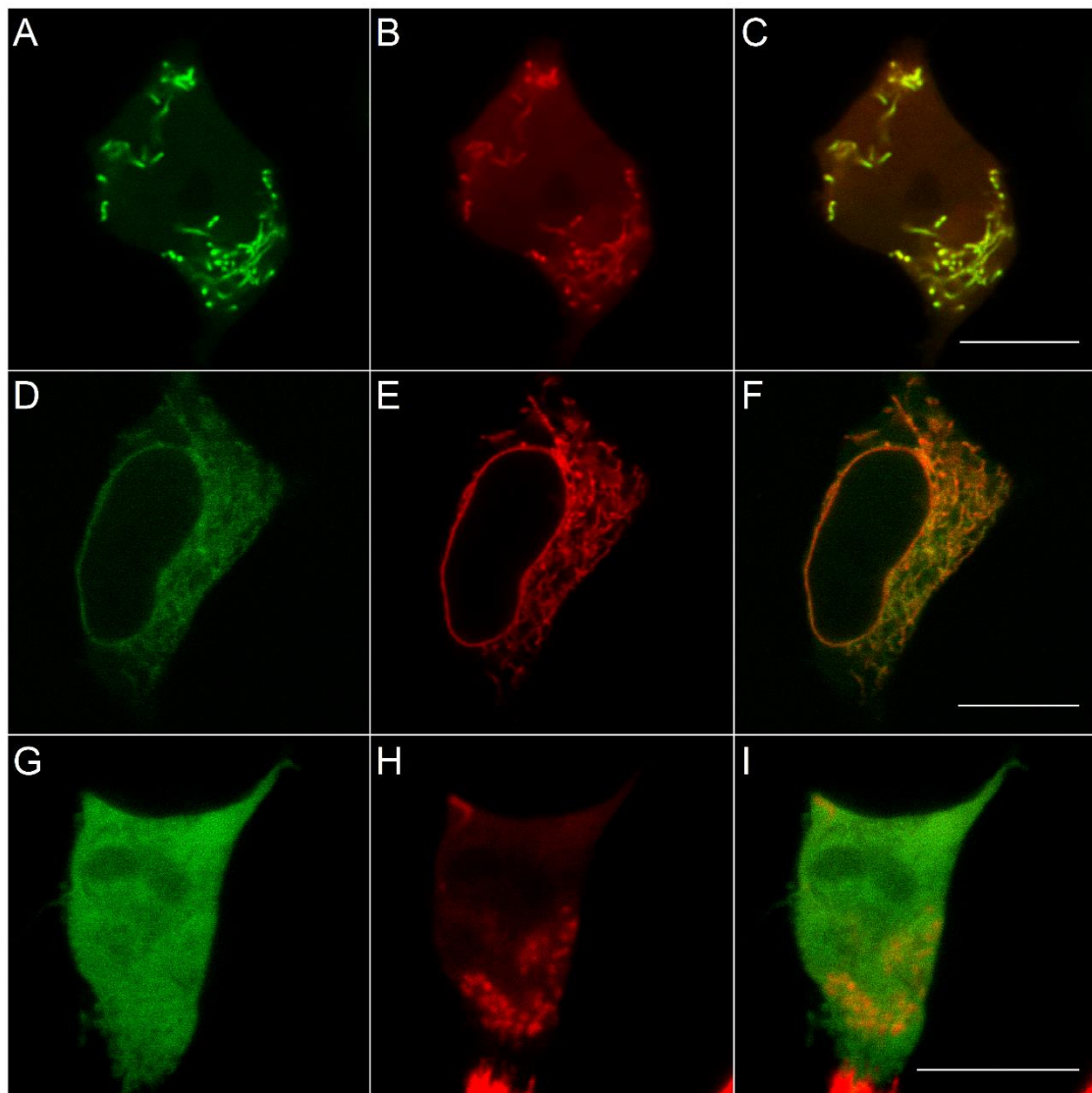


Abbildung 3.3.6: Lokalisation von Kesv₂::eGFP

CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit Kesv₂::eGFP und entweder mit COXVIII::mCherry oder KDEL::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt Kesv₂::eGFP mitochondrial und (G) unsortiert. (B) bzw. (H) zeigen die entsprechenden Zellen mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (C) bzw. (I) das *Overlay* beider Kanäle. (D) zeigt Kesv₂::eGFP ER sortiert, (E) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein KDEL::mCherry und (F) das *Overlay* beider Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

Kesv₃ zeigt sich, ähnlich wie Kesv₂, auch in drei verschiedenen Ausprägungen (siehe **Abbildung 3.3.7**). Zum einen ist Kesv₃::eGFP (A) mitochondrial-sortiert, zum anderen ist Kesv₃ jedoch auch im ER lokalisiert (D). Die erkennbaren Strukturen weisen im ersten Fall eine starke Deckungsgleichheit mit dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry (B) und im zweiten Fall mit dem ER-Markerprotein KDEL::mCherry (E) auf. Im Gegensatz dazu weist die dritte Population (G) keine Kompartiment-spezifische Lokalisation auf und zeigt im Vergleich mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry (H) sogar einen Ausschluss der Mitochondrien und des perinukleären Ringes des eGFP-Signals wie zuletzt bei Kesv_{deopt} zu beobachten war.

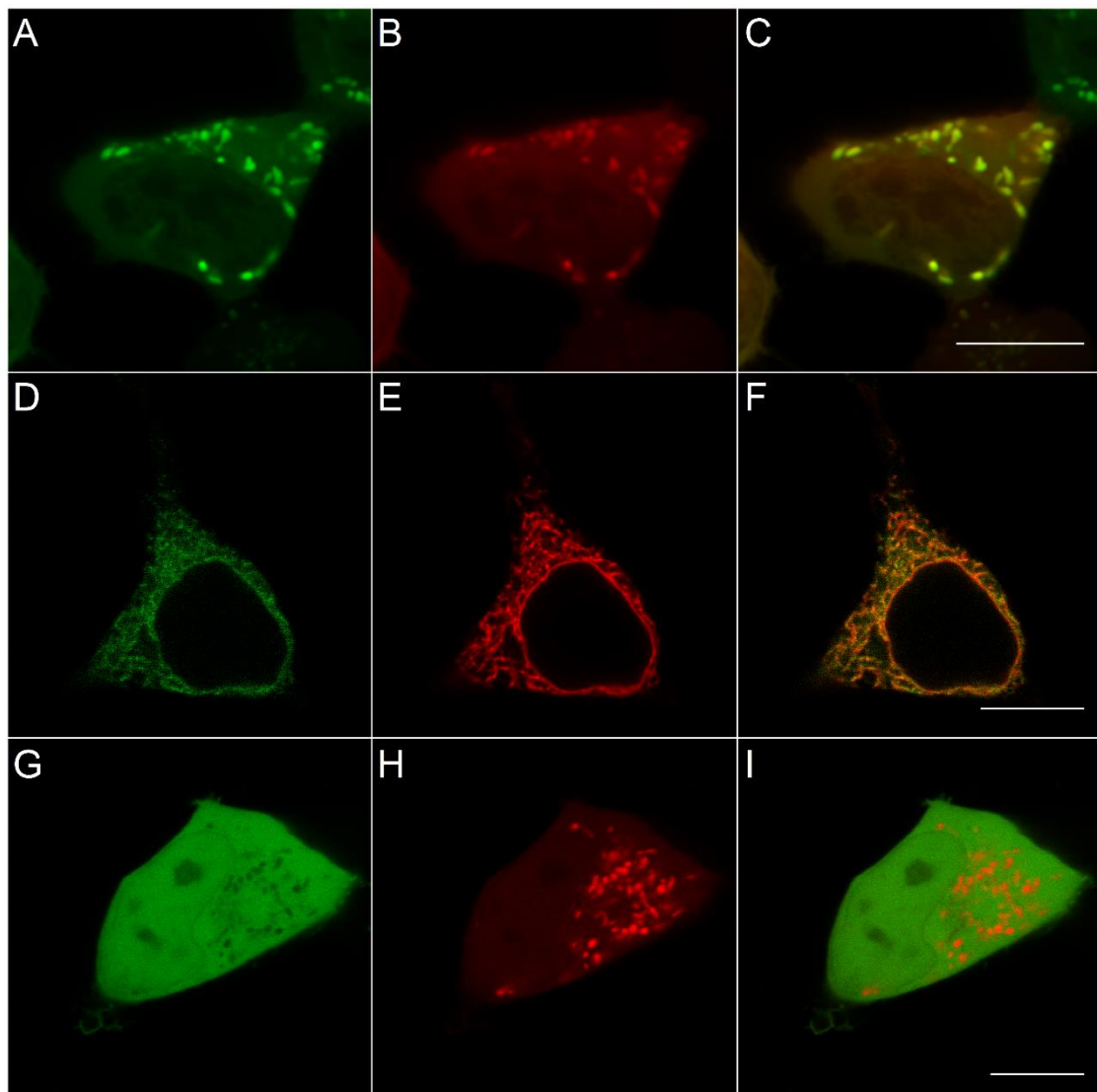


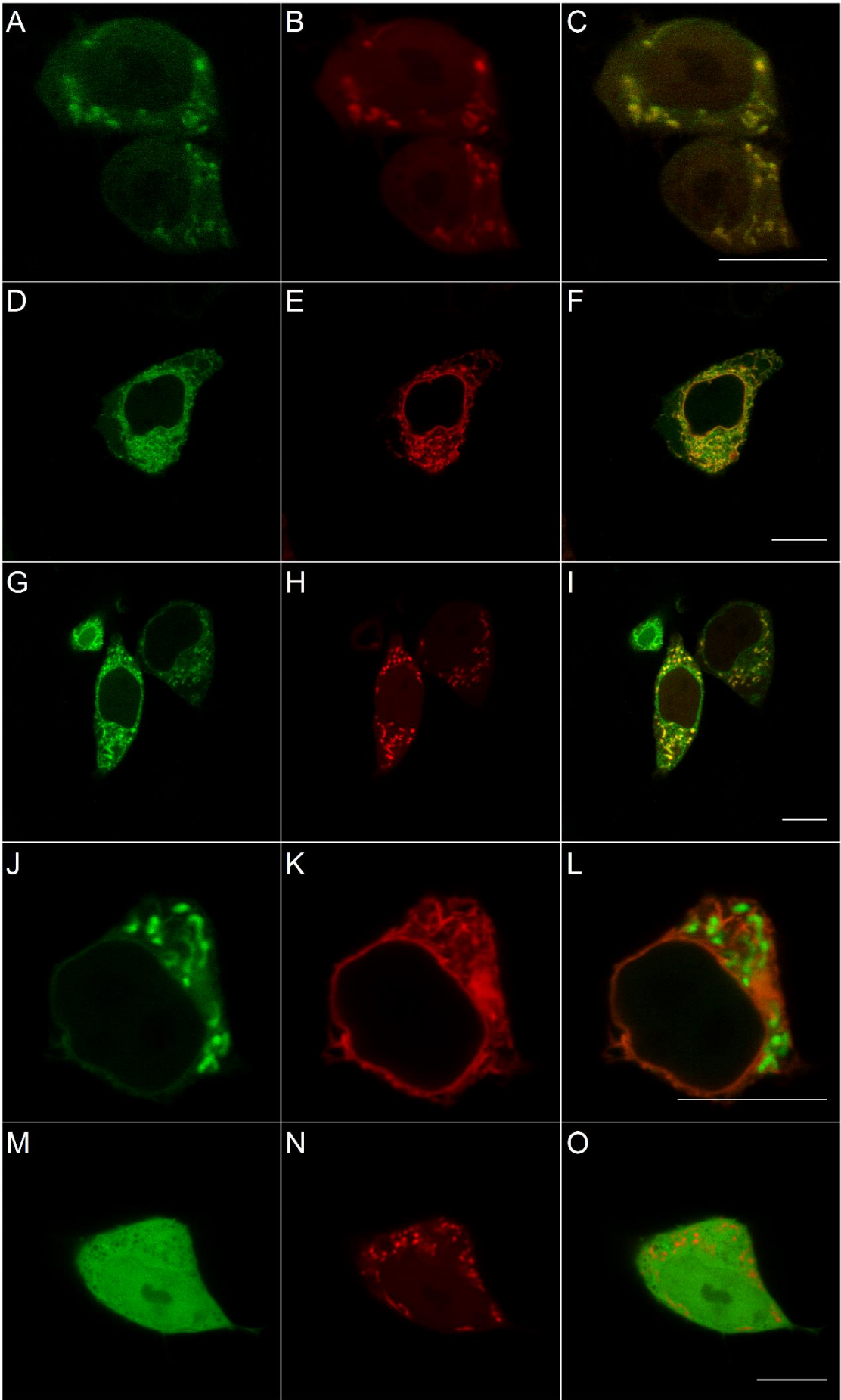
Abbildung 3.3.7: Lokalisation von Kesv₃::eGFP

CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit Kesv₃::eGFP und entweder mit COXVIII::mCherry oder KDEL::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt Kesv₃::eGFP mitochondrial und (G) unsortiert. (B) bzw. (H) zeigen die entsprechenden Zellen mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (C) bzw. (I) das *Overlay* beider Kanäle. (D) zeigt Kesv₃::eGFP ER sortiert, (E) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein KDEL::mCherry und (F) das *Overlay* beider Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

Kesv₄ stellt sich, im Gegensatz zu Kesv₃, in seiner Sortierung eher wie Kesv₁ dar, da Kesv₄ auch vier Sortierungsausprägungen zeigt, obwohl Kesv₄ über einen deutlich geringeren Anteil von Kesv verfügt. Die **Abbildung 3.3.8** zeigt beispielhaft Zellen der beobachteten Populationen. In der in (A) gezeigten HEK293-Zelle liegt Kesv₄ mitochondrial-sortiert vor, da das eGFP-Signal zwar schwächer als das mCherry-Signal des mitochondrialen Markerproteins COXVIII::mCherry (B) jedoch eine hohe Deckungsgleichheit (C) zu diesem Signal aufweist. Die in (D) dargestellte Zelle zeigt Kesv₄ in seiner ER-sortierten Form, da das eGFP-Signal trotz einer erhöhten Hintergrundfluoreszenz mit dem mCherry-Signal des ER Markerprotein lokal zusammenfällt. Ähnlich wie bei Kesv₁ kann auch hier eine neue Sortierungsausprägung beobachtet werden, bei der Kesv₄::eGFP in ein und derselben Zelle in den Mitochondrien und dem ER lokalisiert ist. Exemplarisch hierfür sind die in (G) und (J) der **Abbildung 3.3.8** gezeigten Zellen im Vergleich mit den jeweiligen Markerproteinen der Mitochondrien (H) und des ERs (K). Neben den untersuchten Zellen, die eine klare Sortierung aufweisen, sind auch bei Kesv₄ Zellen zu beobachten, deren Kesv₄::eGFP-Signal (M) nicht klar zugeordnet werden kann und die ein flächiges eGFP-Signal mit punktuellen Aussparungen und unter Ausschluss des perinukleären Rings haben. Ähnlich wie bei Kesv₁ und Kesv₃ liegen die punktuellen Aussparungen teilweise an Orten, an denen Mitochondrien liegen, wie die Gegenüberstellung mit dem Mitochondrien-ständigen Markerprotein-Signal (N) verdeutlicht.

Abbildung 3.3.8 auf der folgenden Seite: Lokalisation von Kesv₄::eGFP

CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit Kesv₄::eGFP und entweder mit COXVIII::mCherry oder KDEL::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt Kesv₄::eGFP mitochondrial und (M) unsortiert. (B) bzw. (N) zeigen die entsprechenden Zellen mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (C) bzw. (O) das *Overlay* beider Kanäle. (D) zeigt Kesv₄::eGFP ER sortiert, (E) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein KDEL::mCherry und (F) das *Overlay* beider Kanäle. (G) bzw. (J) zeigt Kesv₄::eGFP sowohl in Mitochondrien und ER in derselben Zelle lokalisiert. (H) zeigt die entsprechende Zelle aus (G) mit dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry und (K) die entsprechende Zelle aus (J) mit dem ER-Markerprotein KDEL::mCherry. (I) und (L) zeigen die entsprechenden *Overlays* der beiden Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.



Die Chimären Kev₅ und Kev₆ sind unter den Kev-Kev_{opt}-Chimären einzigartig dahingehend, dass sie beide, wenn sie sortiert vorliegen, in den Mitochondrien lokalisiert sind und somit als einzige Chimären nur eine Sortierungsausprägung zeigen.

Die in **Abbildung 3.3.9** (A) dargestellte Zelle zeigt Kev₅ lokalisiert in den Mitochondrien, wie das *Overlay* (C) mit dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry (B) durch die starke Deckungsgleichheit der Fluoreszenzsignale beweist. Ähnlich hierzu ist die in (G) gezeigt Kev₆::eGFP exprimierende HEK293-Zelle, bei der Kev₆ auch mit dem mitochondrialen Markerprotein (H) kolokalisiert. Bei der mikroskopischen Primärbetrachtung von Kev₅ sind jedoch, im Gegensatz zu Kev₆, auch Zellen festzustellen, bei denen keine klare Akkumulation des eGFP-Signals in einem Zellkompartiment auszumachen ist. Zellen wie in **Abbildung 3.3.9** (D) dargestellt, wurden daher als unsortiert kategorisiert.

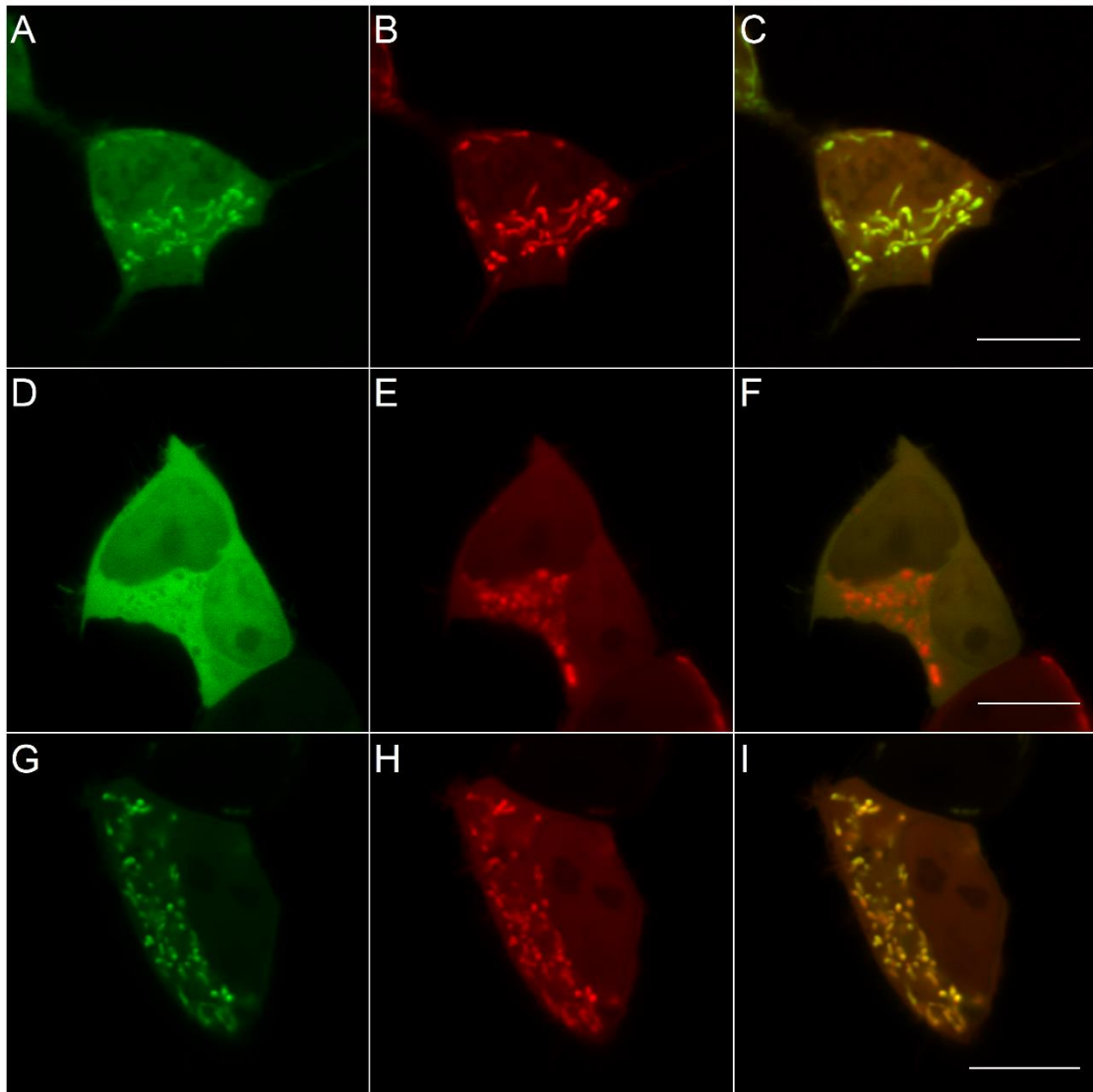


Abbildung 3.3.9 auf der folgenden Seite: Lokalisation von KESV5::eGFP und KESV6::eGFP

CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit KESV5::eGFP bzw. KESV6::eGFP und mit COXVIII::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt KESV5::eGFP mitochondrial und (D) unsortiert. (B) bzw. (E) zeigen die entsprechenden Zellen mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (C) bzw. (F) das *Overlay* beider Kanäle. (G) zeigt KESV6::eGFP mitochondrial-sortiert, (H) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (I) das *Overlay* beider Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 μm .

Nach der mikroskopischen Primärbetrachtung folgte auch bei den KESV-KESV_{opt}-Chimären eine quantitative Untersuchung der Verteilung der Sortierungspopulationen der jeweiligen Chimären, die in **Abbildung 3.3.10** vergleichend dargestellt ist.

- KESV₁ liegt bei $n=197$ betrachteten Zellen zu 47% in den Mitochondrien, zu 29% im ER und in 19% der Zellen unsortiert vor. In 5% der Fälle ist sowohl eine Sortierung in die Mitochondrien als auch in das ER in ein und derselben Zelle festzustellen.

- Kesv₂ weist bei n=139 HEK293-Zellen drei Sortierungspopulationen auf, deren prozentuale Sortierungsverteilung wie folgt ist: Mitochondrial-sortiert 20 %, ER-sortiert 39 % und als unsortiert kategorisiert lagen 41 % der Zellen vor.
- Kesv₃ ähnelt auch in seiner anteiligen Lokalisation Kesv₂ sehr stark. In n=120 Kesv₃::eGFP exprimierenden HEK293-Zellen sind 8 % mitochondrial-sortiert, 51 % ER-sortiert und in 41 % der Zellen ist keine klare Sortierung zu bestimmen, weswegen sie als unsortiert einzuordnen sind.
- Kesv₄ hingegen ähnelt in der Sortierungsverteilung wieder eher Kesv₁. In n=131 Zellen wurden folgende anteilige Lokalisationen in Prozent ermittelt: Mitochondrial-sortiert 37 %, ER-sortiert 43 %, unsortiert 9 %. Die restlichen 11 % der Zellen zeigten sowohl Mitochondrial- als auch ER-typische Strukturen und wurden daher der Kategorie „Mito+ER“ untergeordnet.
- Kesv₅ zeigt, wie bereits angedeutet, in n=121 Zellen, zwei Populationen. Beim Hauptanteil der Zellen liegt Kesv₅ zu 81 % mitochondrial-sortiert vor. Die restlichen 19 % der Zellen zeigen keine klare Sortierung von Kesv₅ und wurden daher als unsortiert eingeordnet.
- Kesv₆ akkumuliert im Gegensatz dazu, ähnlich wie Kesv_{opt}, zu 100 % in n=204 Zellen ausschließlich in den Mitochondrien.

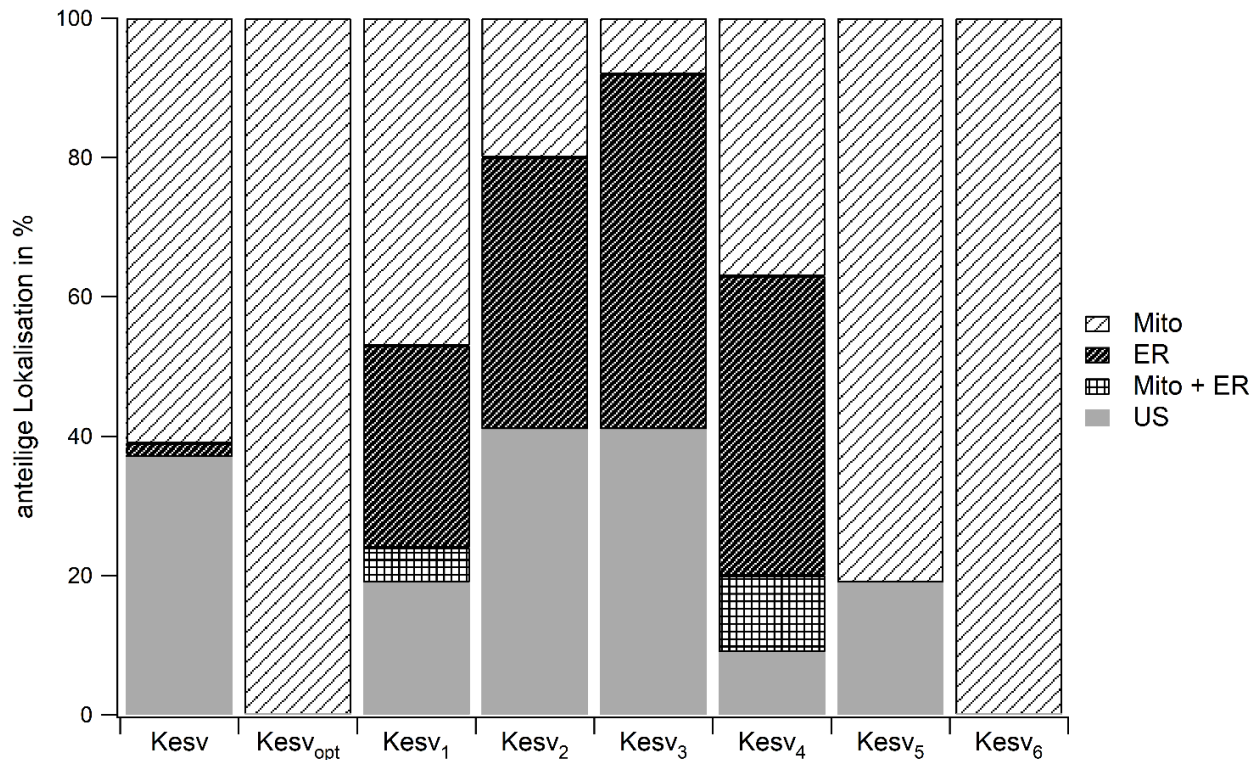


Abbildung 3.3.10: Prozentuale Sortierungsverteilung der Kesv-Kesv_{opt}-Chimären im Vergleich zu Kesv und Kesv_{opt}

Dargestellt ist die anteilige Lokalisation in Prozent von Kesv (n=259) und Kesv_{opt} (n=135) im Vergleich zu den Kesv-Kesv_{opt}-Chimären: Kesk₁ (n=197), Kesk₂ (n=139), Kesk₃ (n=120), Kesk₄ (n=131), Kesk₅ (n=121) und Kesk₆ (n=204). Die Zellen wurden kategorisiert als unsortiert (US), mitochondrial- (Mito) und ER- sortiert (ER). Zudem wurde erstmals die Kategorie „Mito +ER“ beobachtet, die Zellen beinhaltet, deren eGFP-Signal sich sowohl in ER-Strukturen als auch in den Mitochondrien akkumuliert.

Eine andere Art der Darstellung der anteiligen Lokalisation wurde in der **Abbildung 3.3.11** gewählt. Hier wurden nur die Zellen betrachtet, die eine Sortierung in die Mitochondrien oder in das ER aufweisen, und deren Summe als 100 % gesetzt. Somit werden Zellen, die entweder als „unsortiert“ oder als „Mito+ER“ kategorisiert wurden, vernachlässigt.

Diese Art der Darstellung verdeutlicht die Ähnlichkeit der Chimären nicht anhand ihrer Konstruktion, sondern ihrer Lokalisation. So sind sich Kesk₁ und Kesk₄, Kesk₂ und Kesk₃ und Kesk₅ und Kesk₆ jeweils ähnlich auf Ebene ihres ER/Mito-Sortierungsverhältnisses. Kesk₁ und Kesk₄ zeichnen sich durch eine nahezu gleichteilige Sortierung in ER und Mitochondrien aus. Kesk₂ und Kesk₃ hingegen verbindet die Tatsache, dass sie größtenteils in das ER sortiert werden. Kesk₅ und Kesk₆ bilden den Gegenpart hierzu, da sie, wenn sortiert, in jedem Fall in die Mitochondrien sortiert werden. Hier ist besonders herauszustellen, dass wenn es bei einer Chimäre zu einer Sortierung ins ER kommt, der Anteil der ER-sortierten Zellen in jedem Fall größer ist, als der des Wildtyps Kesv.

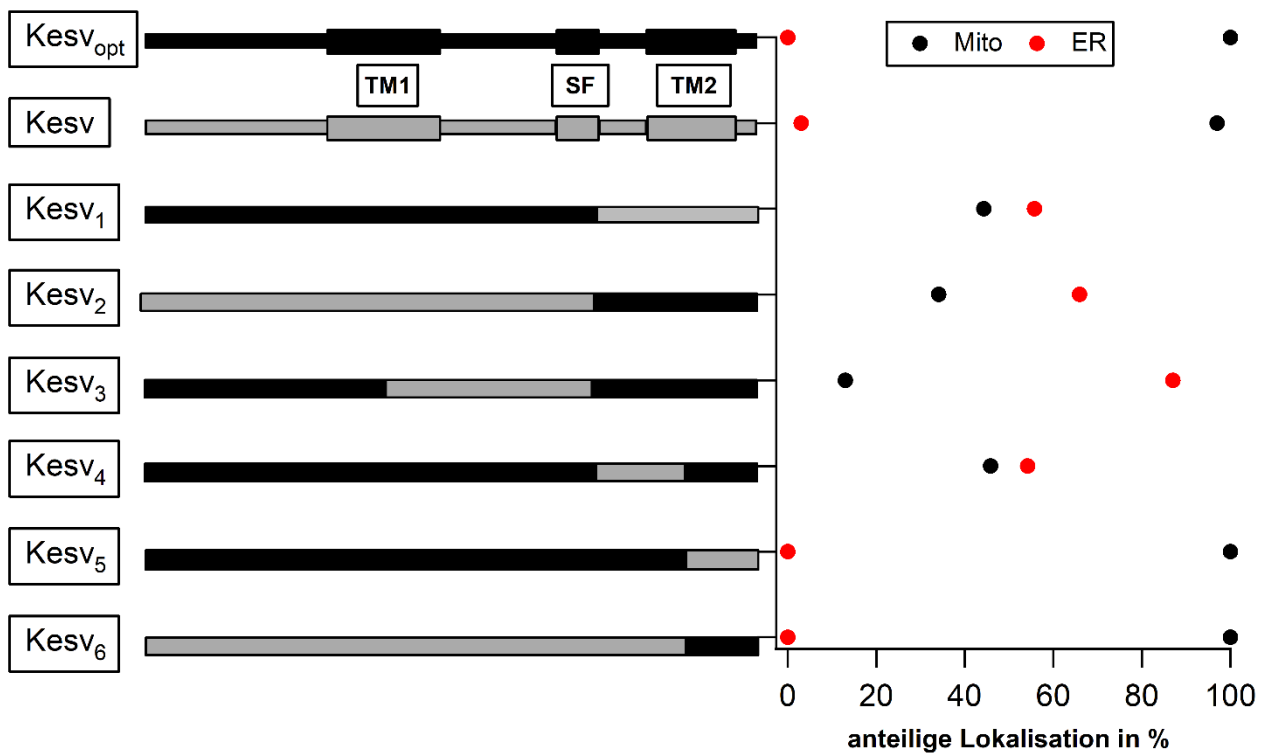


Abbildung 3.3.11: Verteilungsverhältnis der als ER- und mitochondrial-sortiert kategorisierten Zellen der Kesv-Kesv_{opt}-Chimären

Dargestellt ist die anteilige Lokalisation in Prozent der Kesv-Kesv_{opt}-Chimären unter Vernachlässigung der Zellpopulationen, die als unsortiert oder Mito+ER-sortiert kategorisiert wurden, im Vergleich zu Kesv und Kesv_{opt}.

Die erhobenen Daten zeigen, dass die Codonoptimierung von Kesv per se nicht zu einer gesteigerten Sortierung in die Mitochondrien führt. Meist ist sogar das Gegenteil der Fall; das Gros der Kesv-Kesv_{opt}-Chimären wird bevorzugt in das ER sortiert.

Im Fall von Kesv₁ und Kesv₂ führt die Beschleunigung bzw. Entschleunigung der Translationsrate, um die Stelle 113 herum, zu einer bevorzugten Sortierung in das ER. Die Relevanz dieser Region für die Sortierung spiegelt sich also auch an dieser Stelle wieder. Die Chimären Kesv₃ und Kesv₄ sollten den Vergleich zwischen einer früher einsetzenden und längeren Verlangsamung der Translationsrate liefern. Auch hier zeigt sich im Vergleich zu Kesv und Kesv_{opt} eine klare Erhöhung der Sortierung in das ER. Ausnahmen bilden die Chimären Kesv₅ und Kesv₆, die beide deutlich bevorzugt in die Mitochondrien sortiert werden. Erstaunlich hierbei ist das Kesv₆ trotz des geringen Kesv_{opt} Anteils den höchsten Anteil von „Mito“-kategorisierten Zellen aufweist. Die abschnittsweise Codonoptimierung von Kesv zeigt zwar, dass die Position und Länge des codonoptimierten Abschnitts einen entscheidenden Einfluss auf die Sortierung der jeweiligen Chimäre hat, jedoch lässt sich keine klare Struktur erkennen, die eine Position der Codonoptimierung, in Bezug auf die Sortierung von Kesv, relevanter erscheinen lässt als eine andere. Jedoch lässt sich feststellen, dass eine Modulation der Translationsrate erst kurz vor der Stelle 113, wie im Falle von Kesv₅ und Kesv₆ keine Sortierung in das ER erlaubt.

Manche Chimären werden entweder in die Mitochondrien oder in das ER sortiert. Das heißt die Sortierung ist nicht nur abhängig vom Kesv-Konstrukt sondern auch von der individuellen Zelle. Das gleiche Konstrukt kann sowohl den sekretorischen Weg gehen wie auch in die Mitochondrien. Das Warum ist hierbei noch vollkommen unklar, weswegen im Folgenden unterschiedliche kritische Faktoren und Konditionen untersucht wurden, in denen sich einzelne Zellen unterscheiden können. Hierfür wurde meist Kesv₁ als Modellprotein gewählt, da diese Chimäre neben Kesv₄, die gleichmäßigste Verteilung in Bezug auf seine Sortierungspopulationen hat.

Folgende Faktoren wurden bearbeitet:

- A: Untersuchung der Populationsverteilung von Kesv₁ auf dem Coverslip
- B: Untersuchung des Einflusses des metabolischen Status der Zelle auf die Sortierung von Kesv₁
- C: Untersuchung des Einflusses der Zellzyklusphase auf die Sortierung von Kesv₁
- D: Gibt die Mutterzelle ihre Sortierungsweise von Kesv₄ an die Tochterzelle weiter?

A: Untersuchung der Populationsverteilung von Kesv₁ auf dem Coverslip

Zunächst wurde untersucht, wie sich die Populationsverteilung über die Fläche eines betrachteten Coverslips verhält. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob eine Population möglicherweise je von einer Mutterzelle gespeist wird und somit alle zu einer Population gehörigen Zellen in örtlicher Nähe zueinander liegen.

Hierzu wurde ein Coverslip (Ø 35mm) in vier Quadranten geteilt (Schema siehe **Abbildung 3.3.12**) und jeweils 20 Kesv₁::eGFP exprimierende Zellen betrachtet und den oben bereits definierten Sortierungskategorien zugeordnet. Aus **Abbildung 3.3.12** ist zu ersehen, dass trotz der geringen Stichprobenzahl in jedem Quadranten jede Sortierungspopulation vertreten ist und zwar mit folgenden prozentualen Anteilen:

Tabelle 3: Anteilige Lokalisation in Prozent der Sortierungspopulationen in jedem Quadranten

	Quadrant 1	Quadrant 2	Quadrant 3	Quadrant 4
Mito	36 %	52 %	43 %	41 %
ER	23 %	29 %	14 %	41 %
Mito+ER	32 %	14 %	7 %	6 %
US	9 %	5 %	36 %	12 %

Die Größe des mitochondrial-sortierten Anteils ist in jedem Quadranten annähernd gleich, der Anteil der restlichen Sortierungspopulationen ist von Quadrant zu Quadrant schwankend.

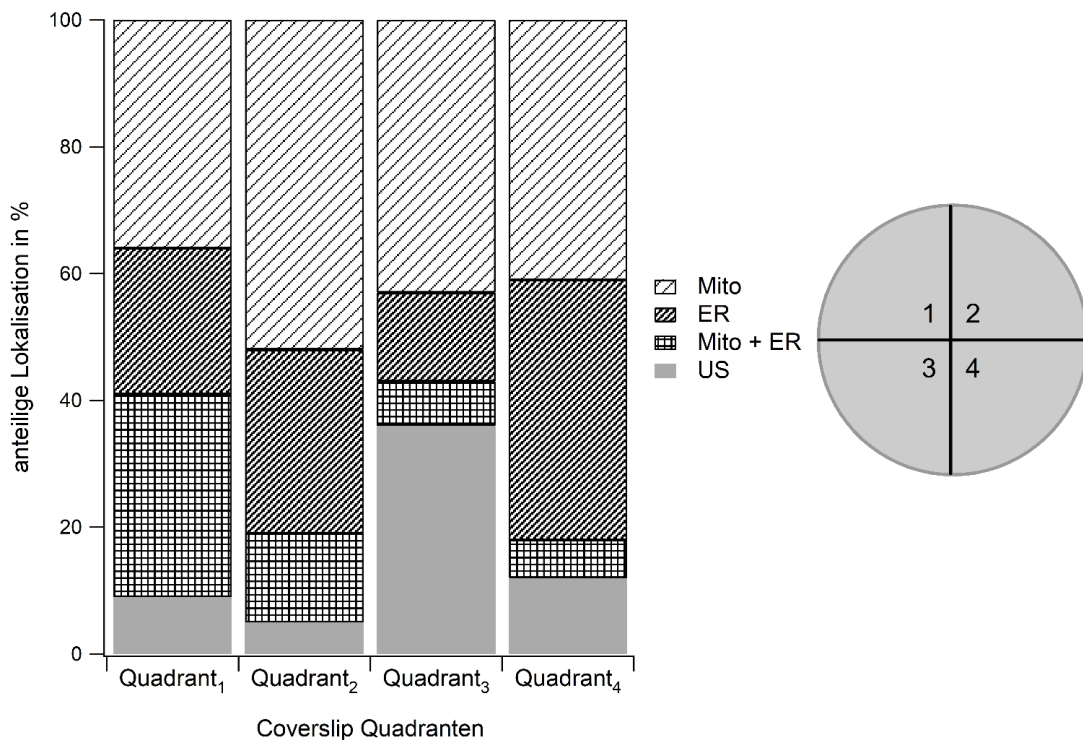


Abbildung 3.3.12: Vergleich der Prozentualen Sortierungsverteilung von Kev₁ in vier Quadranten des Coverslips

Dargestellt ist die anteilige Lokalisation in Prozent von Kev₁ in unsortierter Form, im ER, in den Mitochondrien und gleichzeitig in ER und den Mitochondrien von HEK293-Zellen. Der Coverslip wurde in vier Quadranten unterteilt und die prozentuale Sortierungsverteilung von n=20 Zellen pro Quadrant untersucht.

Die Tatsache, dass in jedem untersuchten Quadranten jede Sortierungspopulation vertreten ist, wenn auch in schwankenden Anteilen, deutet darauf hin, dass keine der Sortierungsausprägungen ein Inselereignis ist, das lokal begrenzt auf dem Coverslip vorliegt. Da somit ausgeschlossen werden konnte, dass der eingeschlagene Sortierungsweg nicht dominierend durch die Mutterzelle vorgegeben ist, wurde des Weiteren untersucht, ob der metabolische Status der Zelle oder die Zellzyklusphase das Verhältnis der Sortierungspopulationen beeinflusst.

B: Untersuchung des Einflusses des metabolischen Status der Zelle auf die Sortierung von Kev₁

Um den metabolischen Status der Zellen zu modulieren, wurde die limitierte Glukoseverfügbarkeit für die Zellen variiert. Hierfür wurden neben dem Standardmedium mit einem Glukosegehalt von 3,1 g/L ein Hoch-Glukose-Medium mit einem Gehalt von 4,5 g/L und ein Niedrig-Glukose-Medium mit einem Glukosegehalt von 1 g/L gewählt und die Zellen 4 h nach Transfektion mit Kev₁::eGFP für 24 h in den jeweiligen Medien aufgezogen.

Bei dem Niedrig-Glukose-Medium stellt Glukose einen limitierenden Faktor dar, wohingegen im Hoch-Glukose-Medium der Zelle Glukose im Überfluss zur Verfügung gestellt wird.

Wie in **Abbildung 3.3.13** zu sehen, führt eine Aufzucht unter Niedrig-Glukose-Konditionen bei $45 \pm 5,8$ % der Zellen zu einer Sortierung in die Mitochondrien, bei $14,7 \pm 10,3$ % der Zellen zu einer Sortierung ins ER, bei $22,7 \pm 4$ % der Zellen zu einer Lokalisation in beiden Zellkompartimenten und bei $17 \pm 0,8$ % der Zellen ist keine Sortierung von Kesv₁ zu erkennen.

Die Aufzucht unter Hoch-Glukose-Kondition hat bei $39 \pm 4,5$ % eine Sortierung in die Mitochondrien, $24 \pm 2,9$ % eine Lokalisation im ER, bei $23 \pm 3,3$ % der Zellen eine Sortierung in beide Zellkompartimente und in $15 \pm 0,8$ % der Fälle keine spezifische Sortierung zu Folge. Vergleicht man diese Befunde mit der Verteilung der Sortierungspopulationen unter Standardbedingungen (Mito= $39 \pm 4,1$ %, ER= $25 \pm 5,2$ %, Mito+ER= $17 \pm 4,5$ %, US= $19 \pm 5,2$ %) so zeigt sich, dass unter keiner der gewählten Konditionen eine Sortierungspopulation verschwindet oder deutlich dominiert.

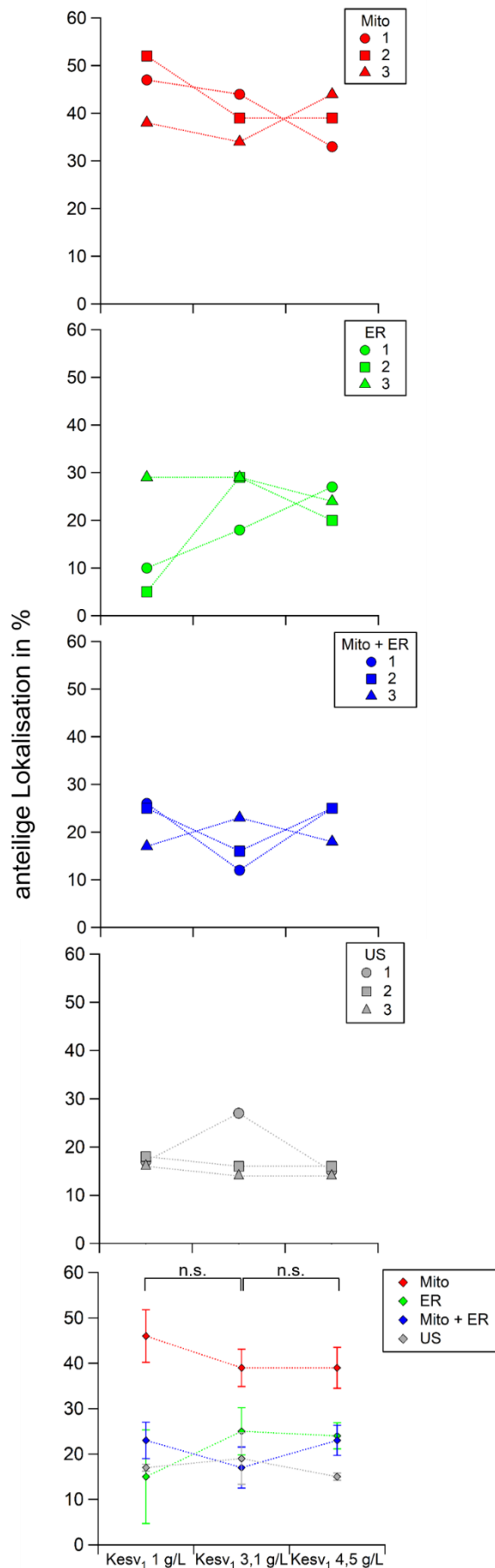


Abbildung 3.3.13: Vergleich der Prozentualen Sortierungsverteilung von Kesv₁ unter Konditionen variierender Glukoseverfügbarkeit

Dargestellt ist die anteilige Lokalisation in Prozent von Kesv₁ in unsortierter Form (grau), im ER (grün), in den Mitochondrien (rot) und gleichzeitig in ER und den Mitochondrien einer Zelle (blau). Jeweils alleine und als Mittelwert (♦) mit Standardabweichung über drei unabhängige Versuchstage hinweg. Es wurden insgesamt n=171 Kontrollzellen in Standardmedium mit 3,1 g/L Glukose im Vergleich zu n= 296 Zellen in Hoch-Glukose-Medium (4,5 g/L) und n= 306 Zellen in Niedrig-Glukose-Medium (1 g/L) an drei unabhängigen Tagen (N=3; ●=Versuch 1, ■=Versuch 2, ▲=Versuch 3) untersucht.

Die Unterschiede, der anteiligen Lokalisation von Kesv₁ bei unterschiedlicher Glukoseverfügbarkeit, im Vergleich mit den Standardmedium, sind nicht signifikant. Die Zellen wurden 4 h nach Transfektion für 24 h im jeweiligen Medium unter Standardbedingungen inkubiert.

Wäre die „Entscheidung“ der Zelle, wie sie Kev₁ sortiert, vom metabolischen Status der Zelle abhängig so wäre zu erwarten gewesen, dass entweder unter Stress oder bei positiveren Konditionen für die Zelle, ein Sortierungsweg deutlich überwiegt. Die tendenzielle Zunahme des „ER“-Anteils bzw. die Abnahme des „Mito“-Anteils ist an dieser Stelle nicht überzuinterpretieren, da das hier gewählte Assay indirekt ist und nicht gemessen werden konnte, inwieweit der Unterschied der Glukosekonzentration realen Einfluss auf den metabolischen Status genommen hat. Zudem sind die Schwankungen der anteiligen Lokalisation an den unterschiedlichen Versuchstagen sehr stark, wie die Standardabweichungen zeigen. Ein Versuchsdesign, das die Glykolyse direkt hemmt – z. B. durch Zugabe von nicht metabolisierbaren Glukose Analoga wie 2-Desoxy-D-Glukose – war in diesem Fall aufgrund der Länge des Versuchsablaufs nicht praktikabel.

Dennoch wäre es sinnvoll bei einer Wiederholung des Versuchsansatzes metabolischen Stress durch entsprechende Marker nachzuweisen.

C: Untersuchung des Einflusses der Zellzyklusphase auf die Sortierung von Kev₁

Das nächste Telexperiment überprüft den Einfluss der Zellzyklusphase, in der sich eine Zelle befindet, und deren Einfluss auf die Sortierung der unterschiedlichen Kev-Konstrukte.

HEK293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, die ohne externe Stimuli mit einer Verdopplungszeit von 24-30 h proliferieren. Über eine Propidium Iodid Färbung (PI), nach Fixierung durch eiskaltes Ethanol, kann die Verteilung der HEK293-Zellen in ihre Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden. PI bindet an DNA und spiegelt dadurch den DNA-Gehalt jeder einzelnen Zelle wieder. Der DNA-Gehalt einer Zelle korreliert wiederum mit der Zellzyklusphase in der sich diese Zelle befindet, weswegen über die Ermittlung des DNA-Gehalts anhand der PI-Fluoreszenzintensität einer Zellpopulation deren Zellzyklusphasen-Verteilung bestimmt werden kann. Die Vermessung von >50.000 unbehandelten HEK293-Zellen nach Ethanol-Fixierung und Färbung mit PI und *gating*-Auswahl der gefärbten Zellen, zeigt typischerweise die in **Abbildung 3.3.14** dargestellte Zellzyklusphasenverteilung. In N=4 unabhängigen Experimenten wurden folgende prozentuale Anteile in den Zellzyklusphasen ermittelt: Der Hauptteil der HEK293-Zellen befindet sich mit $40,35 \pm 3,9$ % in der G1-Phase, $22,3 \pm 0,4$ % der Zellen befinden sich in der S-Phase und $36,3 \pm 3,2$ % der Zellen in der G2-Phase.

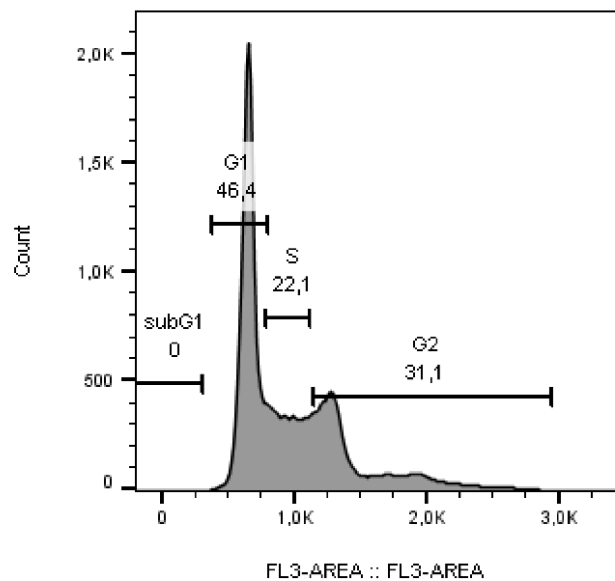


Abbildung 3.3.14: HEK293-Zellen zeigen eine homogene Verteilung der Zellzyklusphasen

Es wurden 50.000 HEK293-Kontrollzellen mit PI gefärbt und vermessen. Die Stärke der Fluoreszenzintensität variiert mit unterschiedlichen Zellzyklusphasen, weswegen hier die Anzahl der Zellen (Count) als Funktion der Fluoreszenzintensität (FL3) aufgetragen wurde. Die Kontrollzellen zeigen eine eindeutige G1-, S- und G2-Phase. Keine Zellen befinden sich in der SubG1-Phase.

Um den Einfluss der Zellzyklusphase auf die Sortierungsverteilung zu bestimmen, wurden HEK293-Zellen mit dem Zellzyklusinhibitor CDK1-Inhibitor RO-3306 ((5Z)-5-(6-Quinolinylmethyl)-2-[(2-thienylmethyl)amino]-4(5H)-thiazolon) behandelt. CDK1-Inhibitor RO-3306 führt in HEK293-Zellen bei einer Endkonzentration von $7 \mu\text{M}$ nach 48 h zu einem effizienten Arrest in der G2-Phase und somit zu einer Umverteilung des Hauptanteils der Zellen von der G1-Phase zur G2-Phase. Die Behandlung der HEK293-Zellen mit $7 \mu\text{M}$ CDK1-Inhibitor RO-3306 führt zu der in **Abbildung 3.3.15** gezeigten typischen Zellzyklusphasenverteilung. Der G2-Phasen-Arrest äußert sich in $N=4$ unabhängigen Experimenten in folgenden prozentualen Anteilen der Zellzyklusphasen: Der Hauptanteil der behandelten HEK293-Zellen befindet sich mit $73,5 \pm 1,5 \%$ in der G2-Phase, $9 \pm 2,9 \%$ in der S-Phase und $19 \pm 2 \%$ der Zellen in der G1-Phase. Der G2-Phasen-Arrest mittels des CDK1-Inhibitors RO-3306 führt somit zu einer Verschiebung der Zellpopulation von $36,3 \pm 3,2 \%$ hin zu $73,5 \pm 1,5 \%$ in G2.

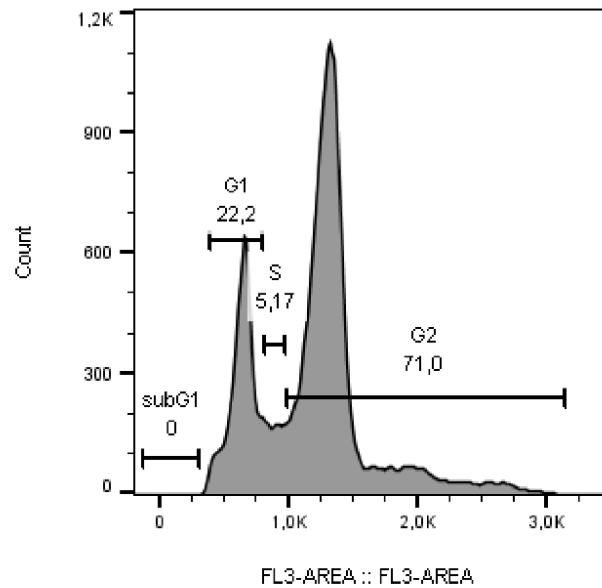


Abbildung 3.3.15: Die Behandlung von HEK293-Zellen mit 7 μ M RO-3306 führt zu einem klaren Arrest in der G2-Phase

HEK293-Zellen wurden mit 7 μ M RO-3306 48 h behandelt und anschließend mit PI gefärbt und 50.000 Zellen vermessen. Die Stärke der Fluoreszenzintensität variiert in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen weswegen hier die Anzahl der Zellen (Count) als Funktion der Fluoreszenzintensität (FL3) aufgetragen wurde. Die Behandelten Zellen zeigen eine eindeutige Verschiebung zur G2-Phase.

Nachdem gezeigt wurde, dass 7 μ M CDK1-Inhibitor zu einem effektiven G2-Phasen-Arrest in HEK293-Zellen führt, wurde diese Inhibitor-Konzentration genutzt, um den Einfluss der Verschiebung hin zu G2 auf die Sortierungsverteilung von Kev₁ zu untersuchen. Die Zellen wurden wie für die FACs-Messungen 24 h vor Transfektion mit Kev₁ und 48 h vor Betrachtung mit 7 μ M CDK1-Inhibitor RO-3306 versetzt. Im Anschluss wurden n=239 Kontrollzellen und n=438 behandelte Zellen an drei unabhängigen Tagen aufgenommen, wie in **Abbildung 3.1.1** und **Abbildung 3.3.3** kategorisiert und die anteilige Lokalisation in **Abbildung 3.3.16** grafisch dargestellt. Die Analyse der Kontrollzellen zeigt die Sortierung von Kev₁ bei $46 \pm 2,16$ % der Zellen in die Mitochondrien, bei $30 \pm 2,49$ % in das ER, bei $5 \pm 1,41$ % in beide Kompartimente, und bei $19 \pm 1,25$ % der Zellen ist keine gezielte Sortierung erkennbar. Der *shift* des Hauptanteils der Zellen von der G1 zur G2-Phase hat folgende Sortierungsverteilung zur Folge: In 29 ± 1 % der betrachteten Zellen ist Kev₁ in den Mitochondrien lokalisiert, in $45 \pm 2,2$ % der Zellen liegt er im ER vor, bei 10 ± 1 % der Zellen in beiden Kompartimenten, und in $16 \pm 1,6$ % der Fälle ist keine Sortierung zu bestimmen.

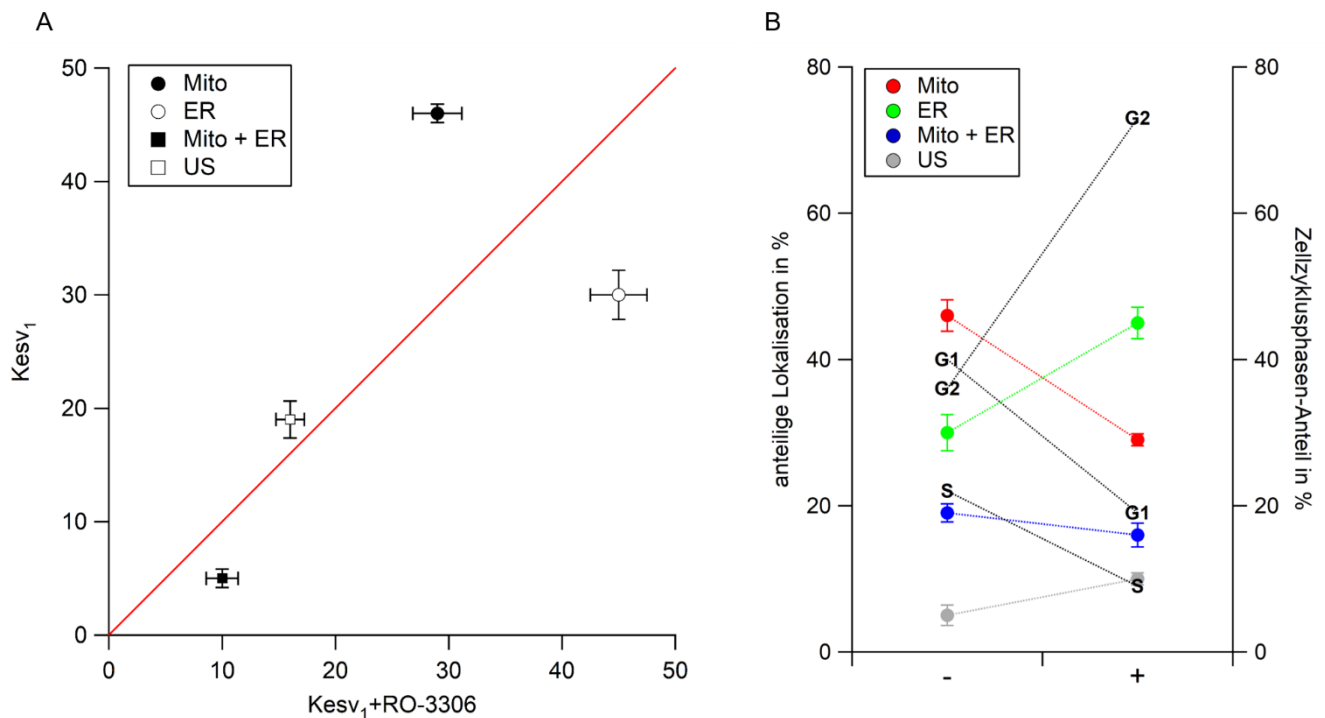


Abbildung 3.3.16: Vergleich der Prozentualen Sortierungsverteilung von Kesv1::eGFP mit und ohne RO-3306-Behandlung

(A) Aufgetragen ist die mittlere, anteilige Lokalisation in Prozent, sowie die jeweilige Standardabweichung von Kesv1::eGFP exprimierenden HEK293-Zellen, in denen Kesv1::eGFP in unsortierter Form, im ER, in den Mitochondrien und gleichzeitig im ER und den Mitochondrien lokalisiert ist. In Rot ist die Winkelhalbierende aufgetragen. Es wurden n=239 Kontrollzellen im Vergleich mit n=438 Zellen untersucht (N=3), die für 48 h mit 7 μ M RO-3306 inkubiert und nach 24 h mit Kesv1::eGFP transfiziert wurden.

(B) Die, wie unter (A) beschrieben, erhaltenen Daten wurden hier vergleichend, gegen die durch PI-Färbung erhobenen Daten (siehe **Abbildung 3.3.14** und **Abbildung 3.3.15**) der prozentualen Zellzyklusphasen-Verteilung mit (+) und ohne (-) RO-3306-Behandlung, aufgetragen (G1= prozentualer Anteil der Zellen in der G1-Phase; S= prozentualer Anteil der Zellen in der S-Phase; G2= prozentualer Anteil der Zellen in der G2-Phase).

Die Zellzyklusarretierung hat also durchaus einen Einfluss auf das Sortierungsverhältnis, da der Anteil der Zellen mit einer Lokalisation des Kanals im ER klar zunimmt und der mit einer Lokalisation in den Mitochondrien deutlich abnimmt (siehe **Abbildung 3.3.16 (B)**).

Wie aus den Vorversuchen zur Zellzyklusabhängigkeit hervorging, sind durch die CDK1-Inhibitor Behandlung ca. 37 % mehr Zellen in der G2-Phase, als ohne eben diese Behandlung. Die quantitative mikroskopische Untersuchung der Sortierungsverteilung von Kesv1 zeigt jedoch nur einen Zuwachs an 16 % „ER“-kategorisierter Zellen als größte Sortierungswegzunahme im Vergleich zu den Kontrollzellen. Betrachtet man jedoch die Zellen, die sich in der G1-Phase befinden, ist etwas auffällig: Durch den Zellzyklusarrest nimmt der Anteil der Zellen, die sich in der G1-Phase befinden, um 21 % ab. Diese Größenordnung entspricht annäherungsweise der Abnahme der mitochondrial sortierten Population

(18 %) nach Behandlung mit dem CDK1-Inhibitor. Somit scheint es eine mögliche Korrelation zwischen den Tatsachen zu geben, dass sich eine Zelle in der G1-Phase befindet und Kev₁ mitochondrial sortiert vorliegt. Dennoch lässt sich die Wahl des sekretorischen Wegs nicht gezielt mit einer Zellzyklusphase in Verbindung bringen, weshalb davon auszugehen ist, dass das „Sortierungsschicksal“ von Kev₁ nicht primär bzw. ausschließlich von der Zellzyklusphase der individuellen Zelle definiert wird.

D: Gibt die Mutterzelle ihre Sortierungsweise von Kev₄ an die Tochterzelle weiter?

Um zu untersuchen, ob es zu einer Umverteilung von Kev₄::eGFP in einer sich teilenden HEK293-Zelle kommt, wurden mehrere Zellen über einen Zeitraum von ca. 18 h alle 3 Minuten (min) mittels CLSM aufgenommen. Dieser Versuch wurde N=10-mal wiederholt bis erstmals eine Kev₄::eGFP exprimierende HEK293-Zelle während der Zellteilung beobachtet werden konnte. Die in **Abbildung 3.3.17** durch einen Kasten gekennzeichnete Zelle wurde aufgrund der Akkumulation des eGFP-Signals sowohl in punktuellen als auch in netzartigen Strukturen als „Mito+ER“ kategorisiert (siehe 3.3.2.). Mit zunehmender Aufnahmedauer blich das eGFP-Signal aus, wodurch die Fluoreszenzsignalstärken-abnahme zu erklären ist. Zu Beginn der Aufnahmen und auch noch nach 15 min hat die Teilung noch nicht begonnen. Ab 30 min verformt sich die Zelle und nach 33 und 36 min ist zunehmend deutlich die Abschnürung der Tochterzelle zu erkennen. Zwischen den Zeitpunkten 39 und 41 min kommt es zur vollkommenen Abschnürung der Mutterzelle von der Tochterzelle wobei klar zu erkennen ist, dass beide Zellen Kev₄::eGFP tragende Mitochondrien mitführen. Bei Betrachtung der darauffolgenden Zeitpunkte (90 und 180 min) sind in beiden Zellen sowohl punktuellen Strukturen als auch netzartige Strukturen, die einen perinukleären Ring bilden, zu erkennen. Somit übernimmt in diesem Fall die sich abteilende Zelle die Sortierungsausprägung der Mutterzelle. Über die Dauer der Messung nimmt die Fluoreszenzintensität durch Ausbleichen der Fluorophore stark ab, weswegen zu den späteren Zeitpunkten (270, 390 und 1080 min) nur noch die Akkumulation der eGFP-Signals in den Mitochondrien klar zu erkennen ist. Dies lässt jedoch nicht auf eine Umsortierung schließen, sondern ist höchstwahrscheinlich der Fluorophor-Ausbleichung zu zuschreiben, die feine ER-Strukturen früher betrifft.

Diese Beobachtung zeigt, wenigstens im Fall dieser Kev₄::eGFP exprimierenden Zelle, dass prinzipiell die Sortierung bzw. der Sortierungsweg, den eine Mutterzelle für Kev₄::eGFP wählt, auch an ihre Tochterzelle weitergegeben werden kann. Ob dies die Regel ist, könnte jedoch erst durch eine deutlich höhere Stichprobenzahl bestätigt werden.

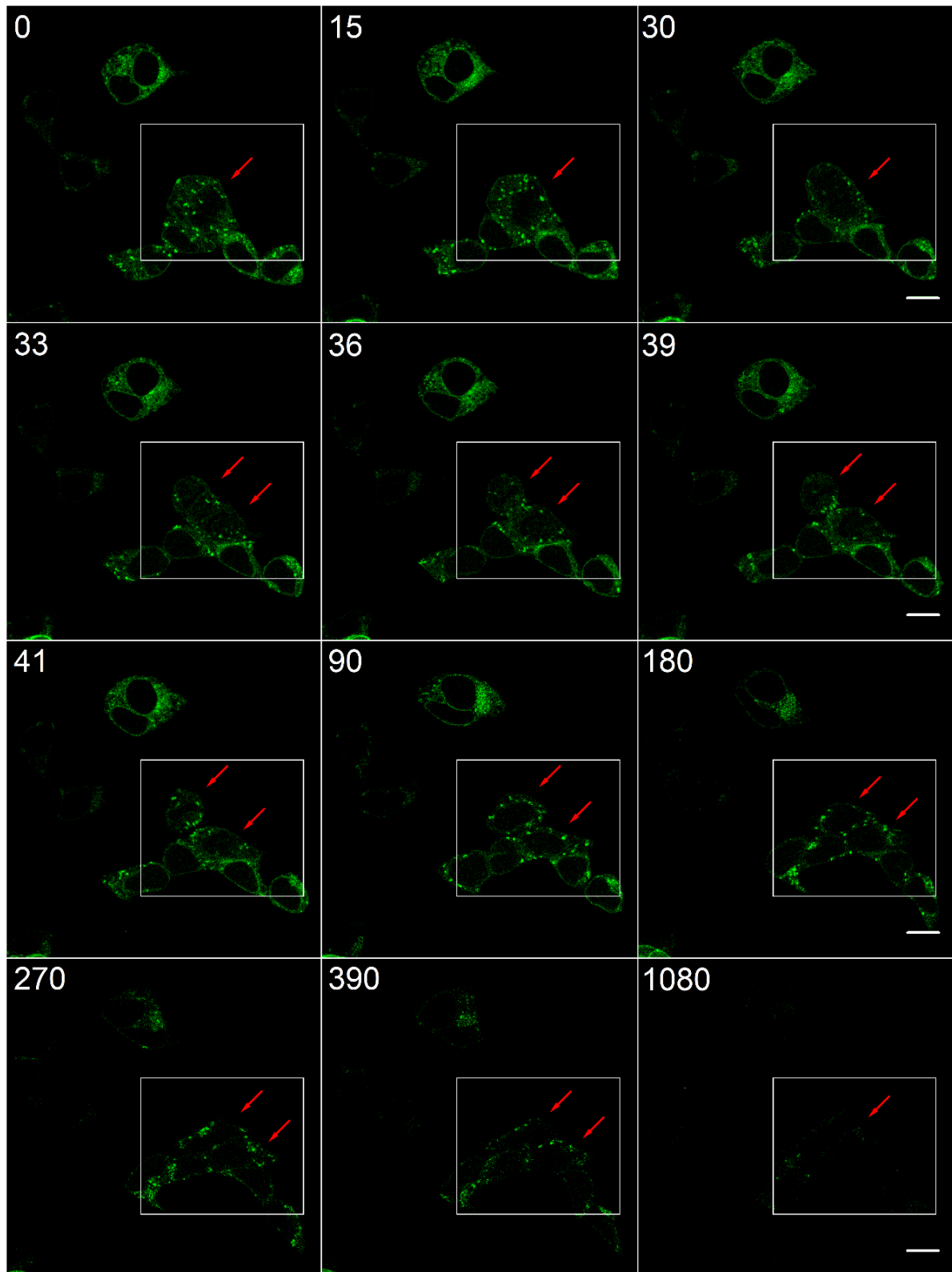


Abbildung 3.3.17: Beobachtung der Zellteilung einer Ksv4::eGFP exprimierenden HEK293-Zelle

HEK293-Zellen wurden 18 h lang alle 3 min mittels CLSM aufgenommen und die Zellteilung der mit Kasten gekennzeichneten Zelle beobachtet. Exemplarisch wurden die Aufnahmen der Zeitpunkte (in min ab Beginn der Aufnahme): 0, 15, 30, 33, 36, 39, 41, 90, 180, 270, 390 und die letzte Aufnahme nach 1080 min (18,5 h) gezeigt. Der Kasten und die Pfeile kennzeichnen die sich teilende Zelle bzw. Mutter und Tochterzelle. Die Größenbalken entsprechen 10 μm .

3.3.4. Untersuchung der Sortierungsverteilung der 30/50-Kesv-Kesv_{opt}-Chimären

Bereits 2008 untersuchten Balss *et al.* die Rolle, die der N-Terminus von Kesv in seiner Proteinsortierung einnimmt. Die ersten 36 AS werden aufgrund mehrerer positiver Aminosäuren und der α -helikalen Struktur als putative mitochondriale *targeting* Sequenz (MTS) vorausgesagt ($P=0,83$ via Mitoprot; Claros und Vincens, 1996). Und in der Tat führt die Fusion von M¹-T³⁶ mit freiem GFP (NT-Kesv:GFP) zu einer Akkumulation des Fluoreszenzsignals in den Mitochondrien. Die Mutation der beiden kritischen Arginine an Position drei und vier hatte jedoch, trotz einer als sehr gering vorausgesagten mitochondrialen Sortierungswahrscheinlichkeit, keine Umsortierung von Kesv zur Folge. Auch der Austausch des N-Terminus von Kcv, der typischerweise ins ER sortiert wird, durch den von Kesv und vice versa führte zu keiner Umsortierung der Ursprungskanäle (Balss, 2007). Daraus kann geschlossen werden, dass die putative MTS von Kesv weder notwendig ist, um Kesv an die Mitochondrien zu rekrutieren, noch stark genug ist, um den ER-Transport von Kcv zu unterbinden.

Da die quantitative mikroskopische Untersuchung von Kesv und der Kesv-Kesv_{opt}-Chimären zeigt, dass Kesv potenziell auch eine ER-Signal-Sequenz in sich trägt, wurde die Rolle des N-Terminus hinsichtlich des ER-Transports untersucht. Im Gegensatz zu einem Algorithmus, der die Sortierung von Proteinen aufgrund von MTSs vorhersagt (Mitoprot II; Claros & Vincens, 1996), prognostizieren die Programme PSortII und TargetP (Balss, 2007) mit höchster Wahrscheinlichkeit einen ER-Import mit sehr geringen Wahrscheinlichkeiten für alle anderen Kompartimente. Die genannten Programme durchmustern die Aminosäuresequenz nach bekannten Signalsequenzen für ER-Retention, Mitochondrien-Import oder Golgi-Export. PSortII erkennt hierbei bei Kesv ER-Retentions-ähnliche Signale im N-Terminus SRRL (XXRR-ähnlich) und im C-Terminus KALE (KKXX-ähnlich). Im Falle der cotranslationalen Proteinsortierung über SRP bindet SRP an hydrophobe N-terminale Erkennungssequenzen oder TM-Segmente. N-Terminale Signalsequenzen (SS) sind hoch konservierte Sequenzabschnitte, die aus ~1-4 positiven AS gefolgt von ~ 8-15 hydrophoben AS und einer *cleavage site* bestehen (von Heijne, 1985). Betrachtet man den N-Terminus von Kesv findet man zwei positive Aminosäuren (R³R⁴), gefolgt von einem stark hydrophoben Bereich (L⁵F⁶A⁷XXI¹¹A¹²I¹³A¹⁴L¹⁵), eine *cleavage site* kann jedoch nicht eindeutig bestimmt werden. Proteine, deren SRP-Bindung TM-vermittelt ist, verfügen klassischerweise über keine SS. Pechmann *et al.* (2014) beschreiben, dass die strategische Einführung eines Clusters nicht-optimaler Codone, ~35-40 Codone downstream eines SS oder TM-Segments, zu einer erhöhten SRP-Bindung *in vivo* führt. Die Länge des ribosomalen Tunnels entspricht ~35-40 Aminosäuren (Pechmann *et al.*, 2014). Daher sollte ein Cluster von nicht-optimalen Codonen ca. 40 AS stromaufwärts von der Stelle, an der das naszierende Protein aus den Tunnel des Ribosoms herausragt, dazu führen, dass die entsprechende Domäne länger in dieser Position verweilt. Dadurch hat

das SRP kinetisch begünstigt länger die Möglichkeit, die SRP-Erkennungssequenz in dem naszierenden Protein zu binden.

In diesem Szenario sollte der Einfluss einer Beschleunigung bzw. Verlangsamung der Syntheserate ab Aminosäure 30 bis 50 durch unterschiedliche Codone auf die Sortierung und die potenzielle Rekrutierung durch SRP von Kesv und Kesv_{opt} untersucht werden.

Dazu wurden zwei weitere Chimären aus Kesv und Kesv_{opt} untersucht. Bei diesen Chimären wurde für den Bereich zwischen AS 30-50 einmal die Sequenz von Kesv (Kesv_{opt30/50wt}) und einmal von Kesv_{opt} (Kesv_{30/50opt}) gewählt.

Das in **Abbildung 3.3.18** gezeigte Schema stellt die Zusammensetzung der Chimären Kesv_{30/50opt} und Kesv_{opt30/50wt} mit den Kanalsequenzübergängen zwischen Kesv und Kesv_{opt} grafisch dar.

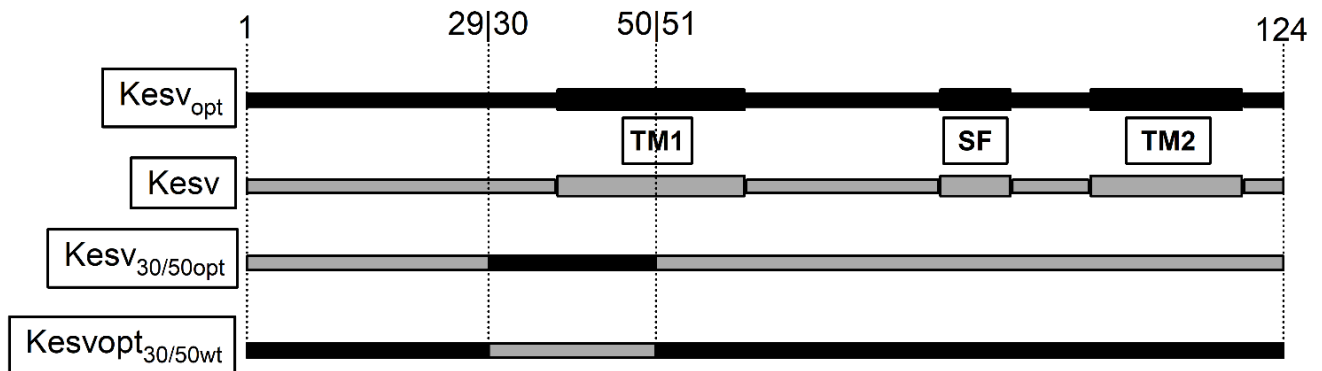


Abbildung 3.3.18: Schema zur Zusammensetzung der 30/50-Kesv-Kesv_{opt}-Chimären:

Es wurden zwei weitere Chimären mit unterschiedlichen Anteilen aus Kesv und Kesv_{opt} hergestellt und deren Zusammensetzung hier schematisch dargestellt. Die schwarzen Anteile stammen der Gen-Sequenz des Kesv_{opt} ab und die grauen Anteile der Gen-Sequenz von Kesv. Die Stelle des Wechsels in der Aminosäure-Sequenz ist durch die gestrichelten Linien und den Zahlenangaben im oberen Bereich markiert. Die Chimären Kesv_{30/50opt} und Kesv_{opt30/50wt} haben jeweils zwei Kanalsequenzübergänge bei AS 30 und AS50. Bei der Chimäre Kesv_{30/50opt} entspricht die Gensequenz AS30-50 Kesv_{opt} und der Rest Kesv. Bei der Chimäre Kesv_{opt30/50wt} entspricht die Gensequenz AS30-50 Kesv und der Rest Kesv_{opt}.

Das in **Abbildung 3.3.19** gezeigte Spektrum der *codon usage* entlang der Gensequenz von Kesv_{30/50opt} (rot) und Kesv_{opt30/50wt} (grün) vermittelt einen Eindruck davon, welchen Einfluss der Kanalwechsel zwischen AS30 und AS50 auf Ebene der Translationsrate potenziell haben kann. Wie schon im Kontext von **Abbildung 3.2.18** erörtert, erscheint durch das gleitende Betrachtungsfenster von 18 AS des %MinMax-Algorithmus (Clarke IV & Clark, 2008) der Effekt, den der Kanalsequenzwechsel auf die *codon usage* hat, verschoben vor AS30. Wie bereits unter 3.2.3 beschrieben darf aus dieser Darstellungsart keine Aussage über reale, lokale Translationsraten getroffen werden.

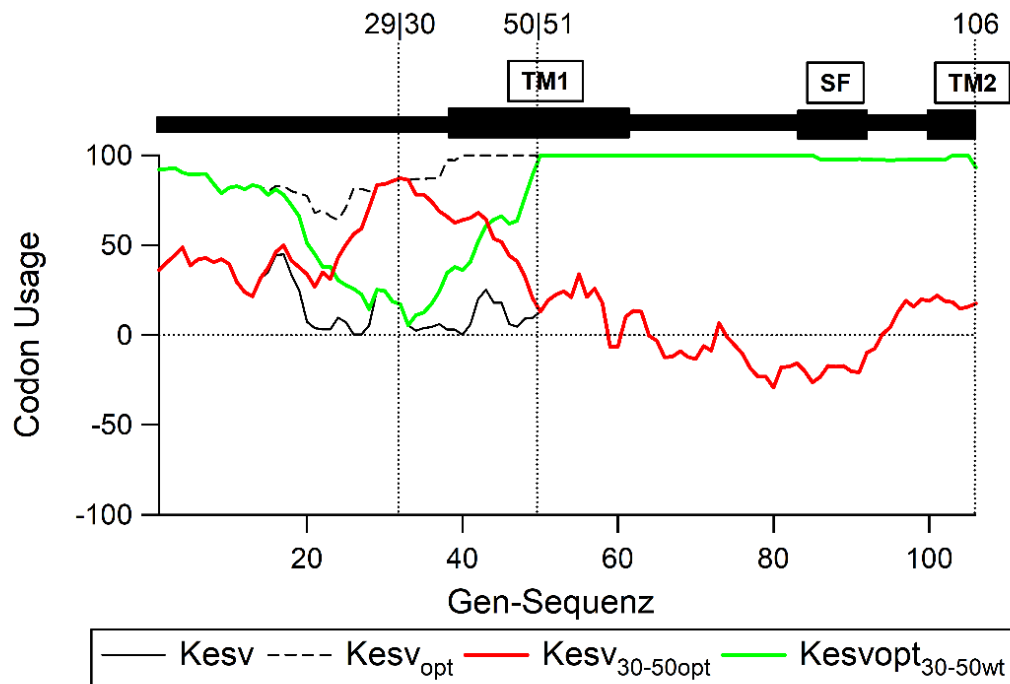


Abbildung 3.3.19: Verlauf der *codon usage* entlang der Gen-Sequenz von Kesv, Kesv_{opt}, Kesv_{30-50opt} und Kesv_{opt30/50wt}

Der Kurvenverlauf der *codon usage* entlang der Gen-Sequenzen von Kesv_{30-50opt} und Kesv_{opt30/50wt} im Vergleich zu Kesv und Kesv_{opt} bis zur AS106 von insgesamt 124 AS. Die Darstellung vermittelt einen Eindruck, über den Effekt auf den *codon usage*-Verlauf, durch die Wechsel zwischen der Kesv und Kesv_{opt} Gen-Sequenz bei den beiden Chimären.

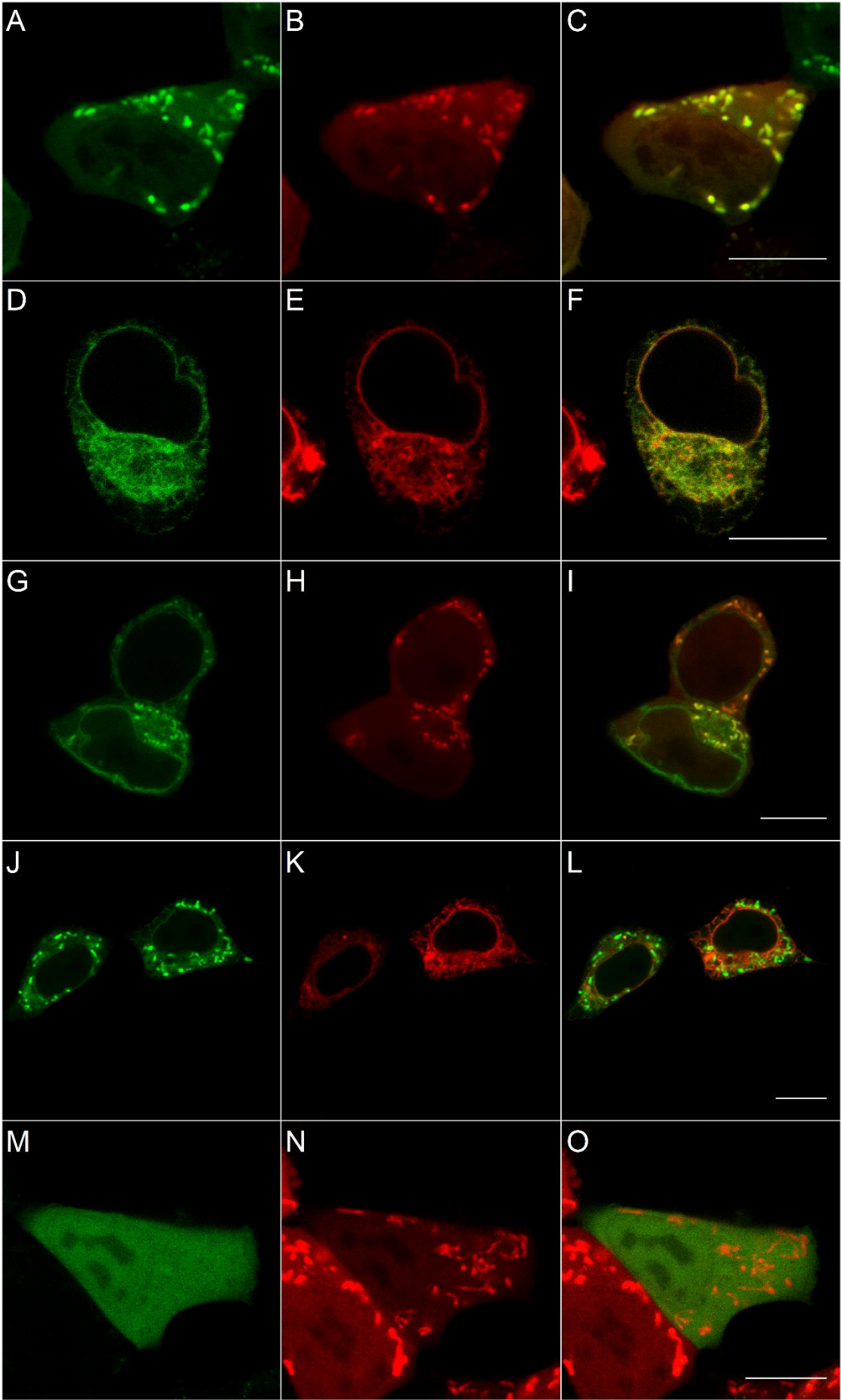
Im Folgenden werden die Ergebnisse der mikroskopischen Primärbetrachtung der 30/50-Kesv-Kesv_{opt}-Chimären näher besprochen und die verschiedenen Sortierungspopulationen, welche die jeweilige Chimäre aufweist, im Vergleich mit den Markerproteinen COXVIII::mCherry (mitochondrial) und KDEL::mCherry (ER) dargestellt.

Wie **Abbildung 3.3.20** zeigt, stellt sich die Sortierung von Kesv_{30/50opt} bei der mikroskopischen Primärbetrachtung auf vier verschiedene Weisen dar. Zum einen ist Kesv_{30/50opt} in einigen Zellen (siehe **Abbildung 3.3.20** (A)) in den Mitochondrien lokalisiert, wie die Kolo-kalisation des eGFP-Signals mit dem mitochondrialen Markerprotein (B) nahelegt. Zum anderen ist Kesv_{30/50opt} in einigen Zellen im ER lokalisiert (siehe **Abbildung 3.3.20** (D)), was wiederum der Vergleich mit dem ER-ständigen Markerprotein KDEL::mCherry (E) bestätigt. Ähnlich wie die Chimären Kesv₁ und Kesv₄ liegt Kesv_{30/50opt} in manchen Zellen sowohl in den Mitochondrien als auch im ER vor. Beispielhafte Zellen für diese Kategorie zeigt **Abbildung 3.3.20** (G) und (J) einmal im Vergleich mit COXVIII::mCherry (H) und einmal im Vergleich mit KDEL::mCherry (K). Neben den deutlich erkennbaren Sortierungsmustern finden sich jedoch auch Zellen, die keine klare Akkumulation des eGFP-Signals in einem Kompartiment tragen, und die sich daher wie in **Abbildung 3.3.20** (M) durch ein flächiges, unsortiertes eGFP-Signal

auszeichnen bei dem es zu keiner spezifischen Kollokalisierung mit dem mitochondrialen Markerprotein (N) kommt.

Abbildung 3.3.20 auf der folgenden Seite: Lokalisation von Kesv_{30/50opt}::eGFP

CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit Kesv_{30/50opt}::eGFP und entweder mit COXVIII::mCherry oder KDEL::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt Kesv_{30/50opt}::eGFP mitochondrial und (M) unsortiert. (B) bzw. (N) zeigen die entsprechenden Zellen mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (C) bzw. (O) das *Overlay* beider Kanäle. (D) zeigt Kesv_{30/50opt}::eGFP ER sortiert, (E) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein KDEL::mCherry und (F) das *Overlay* beider Kanäle. (G) bzw. (J) zeigt Kesv_{30/50opt}::eGFP sowohl in Mitochondrien und ER in derselben Zelle lokalisiert. (H) zeigt die entsprechende Zelle aus (G) mit dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry und (K) die entsprechende Zelle aus (J) mit dem ER-Markerprotein KDEL::mCherry. (I) und (L) zeigen die entsprechenden *Overlays* der beiden Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.



Bei der mikroskopischen Primärbetrachtung von Kesvopt_{30/50wt} ist die Chimäre wie Kesv_{opt} nur in den Mitochondrien lokalisiert. **Abbildung 3.3.21** (A) zeigt exemplarisch eine Kesvopt_{30/50wt} exprimierende Zelle mit einer klaren Kolokalisation des Kanals (C) mit dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry (B).

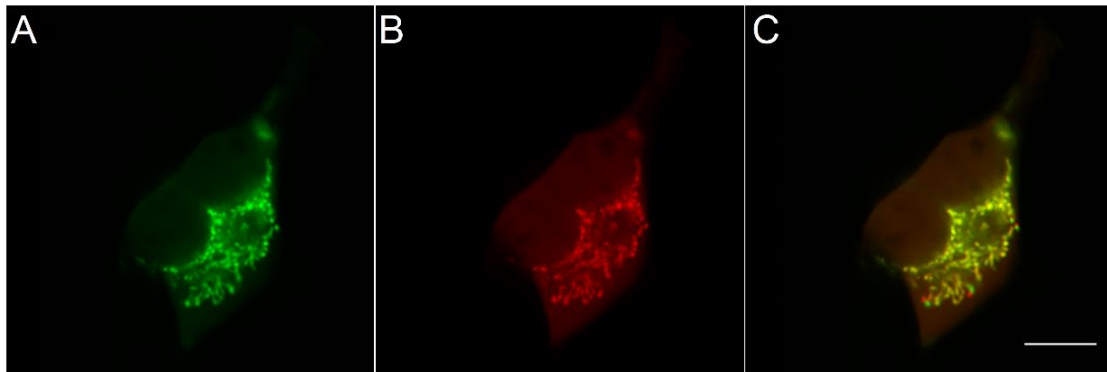


Abbildung 3.3.21: Lokalisation von Kesvopt_{30/50wt}::eGFP

CLSM-Aufnahme einer HEK293-Zelle, die mit Kesvopt_{30/50wt}::eGFP und COXVIII::mCherry transient co-transfiziert wurde. (A) zeigt Kesvopt_{30/50wt}::eGFP mitochondrial sortiert. (B) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (C) das *Overlay* beider Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

Nach der mikroskopischen Primärbetrachtung folgte auch bei den 30/50-Kesv-Kesv_{opt}-Chimären eine quantitative Untersuchung der Verteilung der Sortierungspopulationen der jeweiligen Chimäre, die in **Abbildung 3.3.22** vergleichend dargestellt ist. Die Betrachtung von n=367 Kesv_{30/50opt} exprimierenden HEK293-Zellen ergibt folgendes: 11 % der Zellen fallen in die Kategorie „Mito“, 30 % in die Kategorie „ER“ und 2 % in die Kategorie „Mito+ER“. Mit 57 % lässt der Hauptanteil der betrachteten Zellen keine gezielte Lokalisation von Kesv_{30/50opt} erkennen und wird somit als unsortiert (US) eingeordnet. 100 % der n=261 betrachteten Kesvopt_{30/50wt} exprimierenden Zellen zeigen eine Akkumulation des eGFP-Signals in den Mitochondrien und sind daher als „Mito“ kategorisiert.

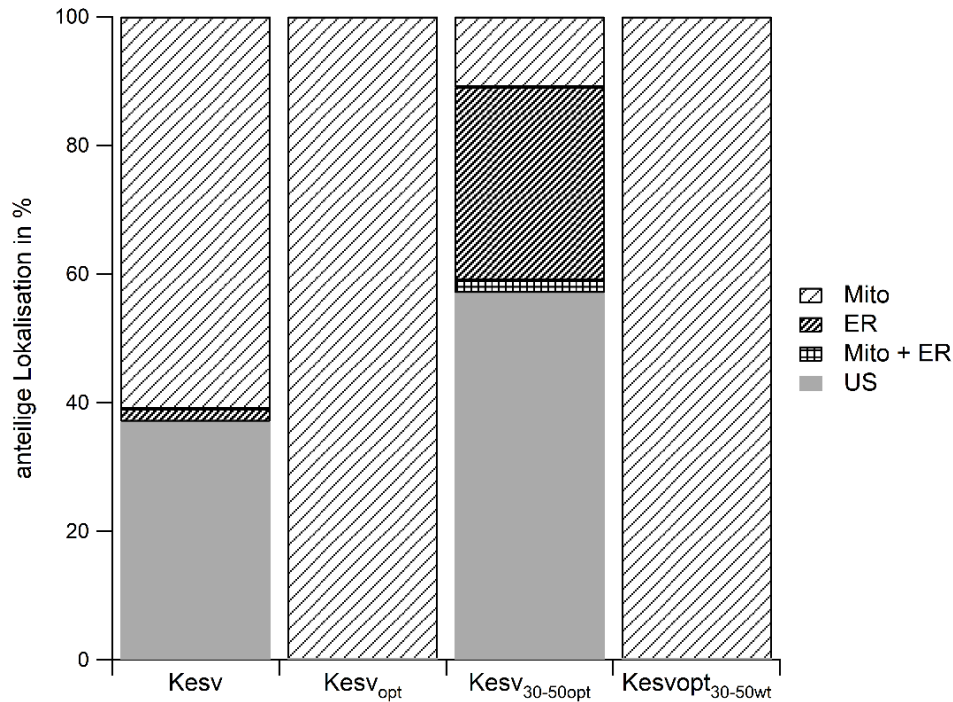


Abbildung 3.3.22: Prozentuale Sortierungsverteilung der 30/50-Kesv-Kesv_{opt}-Chimären im Vergleich zu Kesv und Kesv_{opt}

Dargestellt ist die anteilige Lokalisation in Prozent von Kesv (n=259) und Kesv_{opt} (n=135) im Vergleich zu den 30/50-Kesv-Kesv_{opt}-Chimären: Kesv_{30/50opt} (n=367) und Kesvopt_{30/50wt} (n=261). Die Zellen wurden kategorisiert als unsortiert (US), mitochondrial- (Mito) und ER-sortiert (ER). Zudem wurde die Kategorie „Mito +ER“ beobachtet, die Zellen beinhaltet, deren eGFP-Signal sich sowohl in ER-Strukturen als auch in den Mitochondrien akkumuliert.

Auf den Untersuchungen von Pechmann *et al.* (2014) aufbauend wäre zu erwarten gewesen, dass der Austausch der Aminosäuren 30-50 in Kesv_{opt} gegen die von Kesv zu einer Verlangsamung der Translationsrate über diesen Sequenzabschnitt führt, und dass dies die Bindung des SRP an den Kanal begünstigt. Die erhaltenen Ergebnisse widersprechen jedoch dieser Erwartung, da Kesvopt_{30/50wt} in keinem Fall in das ER sortiert wird. Eine mögliche Erklärung ist, dass der Austausch durch die natürlich gewählten Codone von Kesv unzureichend nicht-optimal ist und somit die Verlangsamung der Translationsrate nicht stark genug ausfällt. Eine Möglichkeit, dies zu untersuchen, läge darin, die Aminosäuren 30-50 nicht durch die vom Kesv-wt-Kanal, sondern stärker de-optimierte Codone (wie in Kesv_{deopt}) zu ersetzen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der Abschnitt 30-50 zu früh in der Sequenz und somit ungünstig gewählt war. Der von Pechmann *et al.* (2014) beschriebene Effekt der gesteigerten SRP-Bindung ist auf ein Cluster nicht-optimaler Codone ~35-40 AS *downstream* eines SS- oder TM-Segments zurückzuführen. Es wäre möglich, dass die Einführung eines nicht-optimalen Codon-Clusters nach ca. 45 AS besser gewesen wäre, um zu gewährleisten, dass bei Verlangsamung der Translationsrate die putative SS den ribosomalen Tunnel bereits passiert hat und von dem SRP erkannt werden kann. Zudem ist die putative N-terminale SS in Kesv möglicherweise nicht ausreichend für eine

SRP-Erkennung oder dient – wie von Balss *et al.* (2008) postuliert – wahrhaftig als MTS, weswegen eine längere Präsentation des N-Terminus keine zusätzliche SRP-Erkennung zur Folge hat.

Im Falle der Chimäre Kesv_{30/50opt} zeigt die Beschleunigung der Translationsrate durch das codonoptimierte Cluster zwischen AS 30-50 eine Zunahme der ER-Sortierung und eine Abnahme der Sortierung in die Mitochondrien. Vergleicht man diesen Befund mit den Annahmen, die in Pechmann *et al.* (2014) gemacht werden, so sind sie eher unerwartet. Aus den Ergebnissen von Pechmann *et al.* (2014) abgeleitet wäre anzunehmen gewesen, dass die Einführung von optimalen Codonen an dieser Position der Sequenz zu einem Verlust der ER-Sortierung führt. Eine mögliche Erklärung, wie es zu einer Erhöhung der ER-Sortierung kommt, wäre, dass in diesem Fall nicht die partielle Beschleunigung die Sortierungswegänderung hervorruft sondern vielmehr der Wechsel von beschleunigter Translationsrate (AS30-50 Kesv_{opt}) zu Wildtyp-Geschwindigkeit der Translationsrate (AS51-124 Kesv). Zum Zeitpunkt des Wechsels von Kesv_{opt} zu Kesv an Aminosäuren 50|51 sollten ~5-10 AS den ribosomalen Tunnel passiert haben und können somit dem SRP präsentiert werden. Nach der Translation optimaler Codone kann der Wechsel auf eine natürliche Codonabfolge möglicherweise als nicht-optimales Cluster interpretiert werden, weswegen der von Pechmann *et al.* (2014) beschriebene Effekt der präferierten SRP-Bindung eintritt. Auffällig ist hierbei, dass mit Abnahme der mitochondrialen Sortierung nicht nur der Anteil der ER-Sortierung sondern auch der Anteil der unsortierten Zellen zunimmt. Dies lässt darauf schließen, dass die Sortierung ineffektiver im Vergleich zu Kesv abläuft – trotz bzw. aufgrund der Einführung optimaler Codone.

3.4. KcV_{PBCV-1}

Der virale Ionenkanal KcV_{PBCV-1} wird durch den Algen befallenden *Paramecium Bursaria* Chlorella Virus (PBCV-1) kodiert (Plugge *et al.*, 2000). Ein Monomer des KcV_{PBCV-1} besteht lediglich aus 94 AS weswegen er als einer der kleinsten bekannten K⁺-Kanäle gilt. Trotz seiner Größe werden für KcV_{PBCV-1} die für pro- und eukaryotischen typischen strukturellen Eigenschaften vorausgesagt. So kann durch Sequenzalignments von Kcv und dem bakteriellen K⁺-Kanal KcsA, dessen Kristallstruktur bereits bekannt ist (Cortes *et al.*, 2001), davon ausgegangen werden, dass Kcv strukturell ein Tetramer bildet, wobei jedes Monomer aus zwei über einen P-Loop verbundenen Transmembrandomänen besteht (Gazzarrini *et al.*, 2003). Hierbei auffällig ist der auf 12 AS verkürzte cytosolische N-Terminus und der fehlende cytosolische C-Terminus (Pagliuca *et al.*, 2007). Dennoch zeigt KcV_{PBCV-1} bei heterologer Expression und auch bei der Rekonstitution im planaren *lipid bilayer* die für K⁺-Kanäle typische K⁺-Selektivität, Ba⁺-Sensitivität und auch eine leichte Spannungsabhängigkeit (Plugge *et al.*, 2000; Hertel *et al.*, 2006; Pagliuca *et al.*, 2007). Diese elektrophysiologischen Untersuchungen legen nahe, dass KcV_{PBCV-1} bei heterologer Expression an die Plasmamembran transportiert wird. Balss (2007) konnte dies mittels mikroskopischer Untersuchungen bestätigen, die deutlich zeigen, dass KcV_{PBCV-1} im ER-lokalisiert vorliegt und somit den sekretorischen Weg einschlägt. Im Folgenden wird KcV_{PBCV-1} nur noch als Kcv, ohne den Zusatz PBCV-1, bezeichnet.

3.4.1. Vorangegangene Studien und Vergleich mit Kesv

Kcv wird durch den *Paramecium Bursaria* Chlorella Virus (PBCV1) kodiert (Plugge *et al.*, 2000) und Kesv durch den *Ectocarpus siliculosus* Virus-1 (EsV-1), somit entstammen beide Kanäle dem Genom eines Virus der *Phycodnaviridae* Familie. Die Aminosäuresequenz von Kesv und Kcv ist zu 29 % identisch. Die Kanäle sind zu 51 % homolog und auch ihre Hydrophobizitäts-Profile sind in großen Teilen sehr ähnlich (Balss *et al.*, 2008; Chappuis *et al.*, 2014).

Zudem sagt die Strukturvorhersage für beide im Vergleich mit dem bekannten, bakteriellen KcsA Kanal (Cortes *et al.*, 2001) einen Aufbau als Tetramer mit aus zwei TMDs bestehenden Monomeren voraus, obwohl Kesv mit 124 AS deutlich länger als Kcv (94 AS) ist (Balss *et al.*, 2008; Gazzarrini *et al.*, 2003). Aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit ist es überraschend, dass das Sortierungsverhalten von Kesv und Kcv komplett unterschiedlich ist. Kcv wird bei einer heterologen Expression in HEK293-Zellen über den sekretorischen Weg an die Plasmamembran gebracht, wohingegen Kesv hauptsächlich (siehe 3.1.2) in die Mitochondrien sortiert und dort höchstwahrscheinlich in die innere mitochondriale Membran inseriert wird (Balss *et al.*, 2008). Dieser Befund erklärt, weswegen Kcv in verschiedenen

Expressionssystemen eine über die Plasmamembran messbare Leitfähigkeit zeigt (Moroni *et al.*, 2002), und Kesv dies in heterologen Expressionssystemen nicht leisten kann (Balss *et al.*, 2008).

Der Mechanismus, dem das unterschiedliche Sortierungsschicksal der beiden Kanäle zu Grunde liegt, wurde bis dato noch nicht entschlüsselt. Auf der Suche nach einer klaren Antwort konnten jedoch schon diverse Erkenntnisse gesammelt werden. Die Mutationsstudien und Versuche, bei denen ganze Domänen der Kanäle ausgetauscht wurden, haben gezeigt, dass Kesv über mindestens zwei Sortierungssignale verfügt. Zum einen trägt Kesv eine putative MTS im N-Terminus, zum anderen weisen strukturelle Eigenschaften auf ein Sortierungssignal im Bereich der zweiten TMD hin. Wird die putative MTS getrennt an GFP fusioniert, kommt es zu einer Sortierung des GFP in die Mitochondrien. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch überraschenderweise, dass Kesv nach Entfernen der MTS oder auch nach der Umwandlung der positiven AS der MTS in negative AS weiterhin in die Mitochondrien sortiert wird (Balss *et al.*, 2008). Die N-terminale MTS von Kesv ist für die gezielte Sortierung in die Mitochondrien dementsprechend nicht zwingend nötig, was es umso wahrscheinlicher macht, dass Kesv im Bereich der zweiten TM ein zusätzliches Sortierungssignal trägt. Versuche, die den Aufbau der zweiten TMD durch die Einfügung zweier Aminosäuren an Position 113 korrumpieren, bestätigen diese Annahme, da die Verlängerung der zweiten TMD eine Sortierung in den sekretorischen Weg zur Folge hat (Balss *et al.*, 2008). Zhang *et al.* (2016) konnten in Hefen zeigen, dass Kesv-VV nach Verlassen des ribosomalen Tunnels zu einem *target* für die löslichen Komponenten des GET-Pathways Sgt2, Get4-5, Get3 wird. Zudem konnte auch gezeigt werden, dass Kcv-*Ribosome-nascent chain*-Komplexe (RNCs) in Abwesenheit von SRP auch Get4-5 rekrutieren, SRP und Get4-5 also cotranslational um Kcv-RNCs konkurrieren, wobei die SRP-Bindung klar bevorzugt wird (Zhang *et al.*, 2016).

Die Fusion der putativen MTS von Kesv an Kcv führt nicht zu einer Umsortierung in die Mitochondrien, was auch im Falle von Kcv für mindestens eine, wenn nicht mehrere ER-Signalsequenzen spricht, die das Sortierungsschicksal von Kcv dominieren (Balss *et al.*, 2008).

Eine weitere von Balss *et al.* (2008) untersuchte Chimäre, die aus der ersten TMD von Kcv und der zweiten TMD von Kesv besteht, wird in den sekretorischen Weg sortiert und bestätigt damit die Annahme, dass Kcv eine starke ER-Signalsequenz im Bereich der ersten TMD hat. Zudem lässt die Gesamtheit der Experimente darauf schließen, dass die mitochondriale Sortierung von Kesv störanfälliger ist als die Sortierung in das ER von Kcv.

3.4.2. Statistische Analyse der prozentualen Lokalisation von Kcv::eGFP

Ähnlich wie in 3.1.2 beschrieben wurde auch in den mit Kcv::eGFP durchgeführten Studien positive Lokalisation untersucht und diskutiert. Im Folgenden wurde ähnlich wie im Falle von Kesv::eGFP

vorgegangen und Konstrukte, die von Chappuis (2013) bereits beschrieben wurden, erneut mikroskopisch untersucht und ihre Sortierungsverteilung quantitativ bestimmt.

In jedem Fall wurden hierfür >100 transfizierte HEK293-Zellen aufgenommen und in die unter **Abschnitt 3.3.2** beschriebenen und in **Abbildung 3.1.1** gezeigten Kategorien eingeordnet.

Wie bereits von Chappuis (2013) beschrieben ist Kcv bei einer Expression in HEK293-Zellen im ER lokalisiert. Exemplarisch ist dies in **Abbildung 3.4.1 (A)** dargestellt. Die Kolo-kalisation mit dem ER-ständigen Markerprotein KDEL::mCherry (**Abbildung 3.4.1 (B)**) bestätigt diese Aussage eindeutig. Neben der von Chappuis (2013) beschriebenen Sortierung in das ER zeigt sich Kcv in HEK293-Zellen jedoch auch flächig verteilt ohne zellkompartiment-spezifische Struktur. Eine hierfür beispielhafte Zelle ist in **Abbildung 3.4.1 (D)** im Vergleich mit dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry gezeigt. Ferner wurde diese Sortierungsausprägung auch im Falle von Kcv als unsortiert kategorisiert.

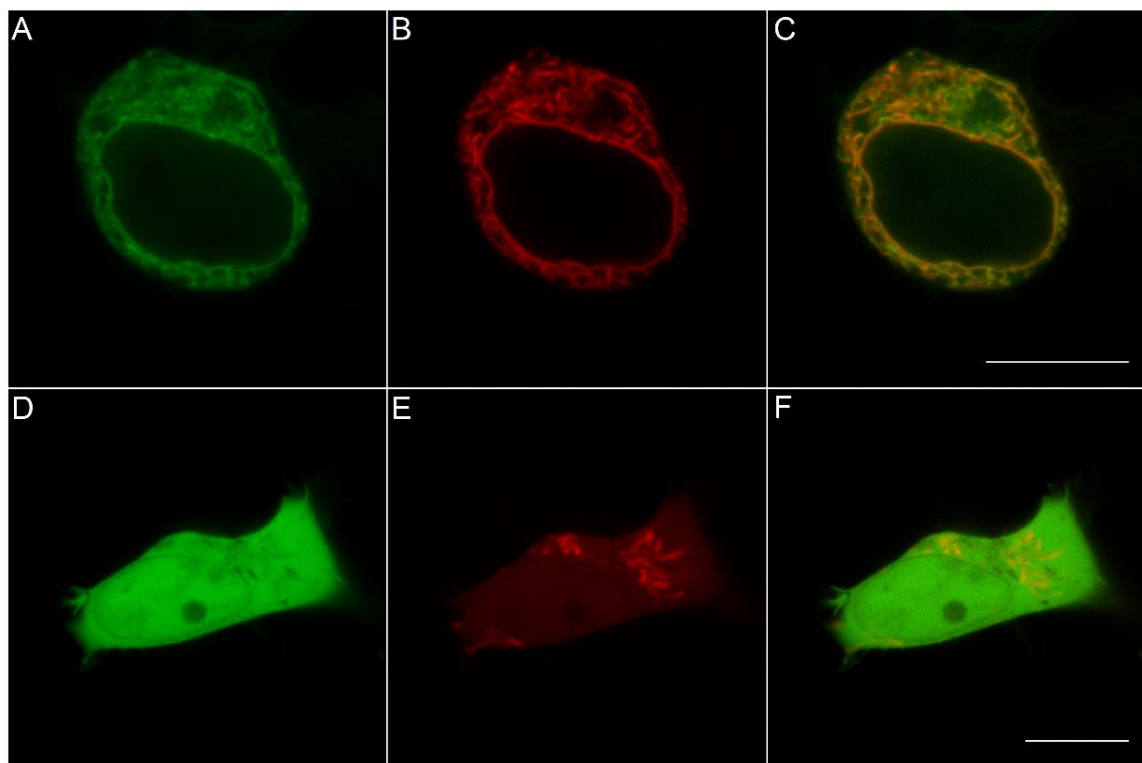


Abbildung 3.4.1: Lokalisation von Kcv::eGFP

CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit Kcv::eGFP und entweder mit COXVIII::mCherry oder KDEL::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt Kcv::eGFP im ER lokalisiert, (B) die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein KDEL::mCherry und (C) das *Overlay* beider Kanäle. (D) zeigt Kcv::eGFP unsortiert, (E) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (F) das *Overlay* beider Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 μ m

Für die statistische Untersuchung von Kcv::eGFP wurden an verschiedenen Tagen insgesamt n=110 HEK293-Zellen mittels CLSM aufgenommen und kategorisiert.

In 93 % der Zellen konnte eine Lokalisation von Kcv::eGFP im ER eindeutig bestimmt werden. Die restlichen 7 % der Zellen zeigten keine klare Sortierung und werden dementsprechend der Kategorie „unsortiert“ zugeordnet (siehe **Abbildung 3.4.2**).

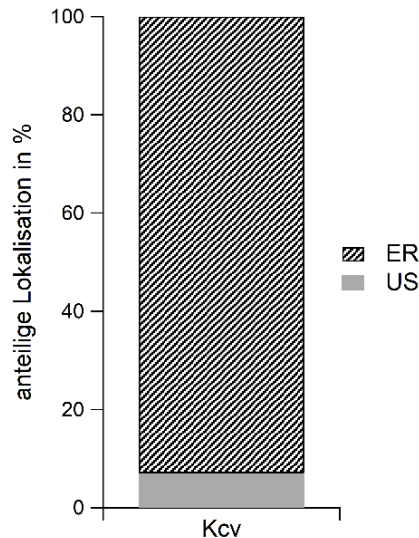


Abbildung 3.4.2: Prozentuale Verteilung von Kcv auf die Zellkompartimente

Aufgetragen ist die anteilige Lokalisation in Prozent von Kcv (n=110) in das ER und im Cytosol von HEK293-Zellen.

Durch die statistische Untersuchung des Sortierungsverhältnisses von Kcv::eGFP soll ähnlich wie im Falle von Kesv::eGFP ein besseres Verständnis darüber erlangt werden, wie stark das *targeting* von Kcv::eGFP in der Summe der HEK293-Zellen variiert. Wie bereits von Chappuis (2013) und Balss (2007) angenommen, zeigt sich auch hier, dass die Sortierung von Kcv::eGFP stabiler verläuft im Vergleich zu Kesv::eGFP, da nur in wenigen Fällen die Sortierung in den sekretorischen Weg erfolglos verläuft.

3.5. Kcv_{opt}

Im Folgenden wird untersucht, ob und welchen Einfluss die Codonoptimierung von Kcv auf dessen Sortierung hat. So stellt sich die Frage, ob über die Optimierung der Codone der bestehende Sortierungsweg wie bei Kesv gestärkt wird, oder ob dieser Effekt nur bei einer vorherrschenden Lokalisation in den Mitochondrien und somit einer höchstwahrscheinlich posttranslational ablaufenden Sortierung eintritt.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zunächst der synthetische Kanal Kcv_{opt} vergleichend mit Kcv untersucht. Die Basensequenz von Kcv_{opt} wurde dazu, wie im Falle von Kesv_{opt}, für eine Expression in humanen Zellen optimiert; die gewählten Codone haben einen hohen *Codon Adaptation Index* (CAI) und bilden zudem keine Motive aus, die der Proteinexpression negativ entgegenwirken.

Der Vergleich des CAI und des GC-Gehalts von Kcv_{opt} und Kcv anhand von bioinformatischen Berechnungen² zeigt, dass Kcv_{opt} erwartungsgemäß mit 0,99 sowohl einen höheren CAI (Kcv: 0,66) als auch mit 56 % einen deutlich höheren GC-Gehalt (Kcv: 39 %) aufweist.

Die mikroskopische Untersuchung von Kcv_{opt}::eGFP zeigt eine klare Sortierung in das ER. **Abbildung 3.5.1** zeigt in (A) eine exemplarische Zelle, bei der Kcv_{opt}::eGFP im ER lokalisiert vorliegt. Die hohe Deckungsgleichheit mit dem ER-ständigen Markerprotein KDEL::mCherry (B) bestätigt diese Aussage deutlich. Neben Zellen, die eine klare ER-Sortierung von Kcv_{opt}::eGFP aufweisen, gibt es jedoch auch HEK293-Zellen, in denen das eGFP-Signal flächig und ohne definierte Struktur vorliegt. Eine beispielhafte Zelle für diese Sortierungsausprägung ist in **Abbildung 3.5.1** (D) dargestellt. Auch der Vergleich mit COXVIII::mCherry (E) zeigt keine Kolo­kalisation (F) des eGFP- und des mCherry-Signals.

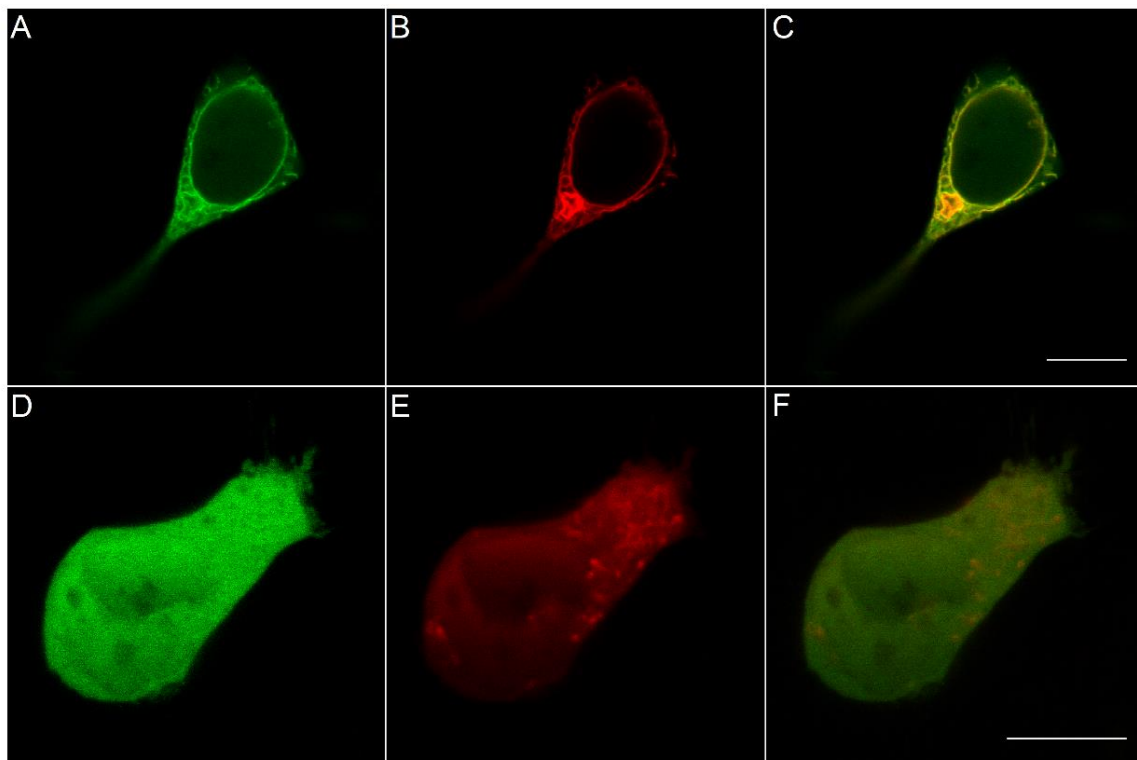


Abbildung 3.5.1: Lokalisation von Kcv_{opt}::eGFP

CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit Kcv_{opt}::eGFP und entweder mit COXVIII::mCherry oder KDEL::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt Kcv_{opt}::eGFP im ER lokalisiert, (B) die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein KDEL::mCherry und (C) das *Overlay* beider Kanäle. (D) zeigt Kcv_{opt}::eGFP unsortiert, (E) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (F) das *Overlay* beider Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

² <https://www.biologicscorp.com/tools/CAICalculator> (Stand: 17.06.2018)

<https://www.biologicscorp.com/tools/GCContent/#.W8bvWvaYS70> (Stand: 17.06.2018)

Auch die Kategorisierung von $n=145$ Kcv_{opt}::eGFP exprimierenden HEK293-Zellen spiegelt eine klare Sortierung in den sekretorischen Weg wider. Bei 99 % der Zellen liegt Kcv_{opt}::eGFP im ER lokalisiert vor und nur bei 1 % der Zellen ist keine spezifische Sortierung festzustellen (siehe **Abbildung 3.5.2**).

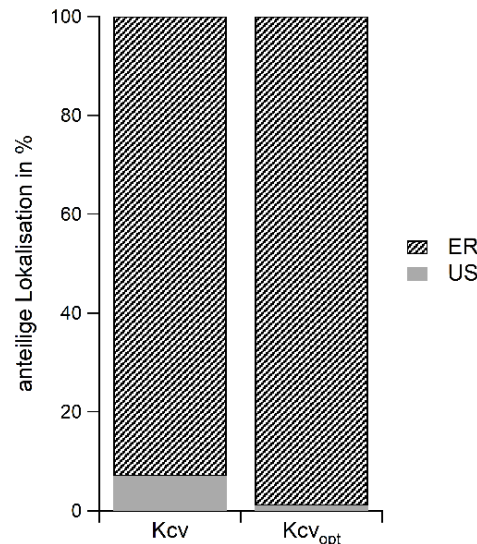


Abbildung 3.5.2: Prozentuale Sortierungsverteilung von Kcv_{opt} im Vergleich zu Kcv

Dargestellt ist die anteilige Lokalisation in Prozent von Kcv ($n=110$) und Kcv_{opt} ($n=145$) im ER und im Cytosol von HEK293-Zellen.

Somit wird die erfolgreiche Sortierung in den sekretorischen Weg durch die Codonoptimierung von Kcv nochmals um 6 % gesteigert und eine Fehlsortierung zur klaren Ausnahme.

Ähnlich wie im Falle von Kesv hat auch bei Kcv die Codonoptimierung auf humane Expressionssysteme eine Stärkung des Hauptsortierungswegs, des *targetings* des sekretorischen Weges, zur Folge.

Dies lässt darauf schließen, dass eine Erhöhung der Sortierungseffizienz ein nicht auf die posttranslationale Sortierung in die Mitochondrien beschränkter Effekt der Translationseffizienzsteigerung ist. Dass Kesv eventuell cotranslational über die sogenannten *Mitochondrial Associated Membranes* (MAMs) in die Mitochondrien transportiert wird, konnte bereits von Chappuis (2015) experimentell widerlegt werden. Somit wird durch die Codonoptimierung der dominierende Sortierungsweg eines Konstrukts, unabhängig davon, ob er co- oder posttranslatonaler Natur ist, unterstützt.

3.6. Kcv-Kesv-Chimären

3.6.1. Vorangegangene Studien

Wie bereits in **Abschnitt 3.4.1** beschrieben, unterscheiden sich Kcv und Kesv trotz ihrer sequentiellen und strukturellen Ähnlichkeit grundlegend in ihrer Sortierung. Eine Chimäre, die aus der ersten TMD von Kcv und der zweiten TMD von Kesv besteht, wird in den sekretorischen Weg sortiert und legt deshalb nahe, dass Kcv ein starkes ER-Sortierungssignal in der ersten TMD trägt (Balss *et al.*, 2008).

Um die Rolle der ersten TMD von Kcv eingehender zu beleuchten, generierte und untersuchte Chappuis (2013) sechs weitere Chimären beider Kanäle. **Abbildung 3.6.1** zeigt schematisch das Design eines Monomers der sechs Chimären. Alle Chimären bestehen aus dem N-Terminus, der zweiten TMD und dem C-Terminus von Kesv. Der zentrale Bereich der Chimären entstammt von Chim1 zu Chim6 abnehmenden Anteilen aus Kcv. Die Kesv entstammenden Randbereiche, die N-terminale MTS und die zweite TMD, sollten eine mitochondriale Sortierung bevorzugen, wohingegen der Kcv entstammende mittlere Bereich der Chimären eine putative ER-Sortierungssequenz und somit eine Sortierung in den sekretorischen Weg favorisiert.

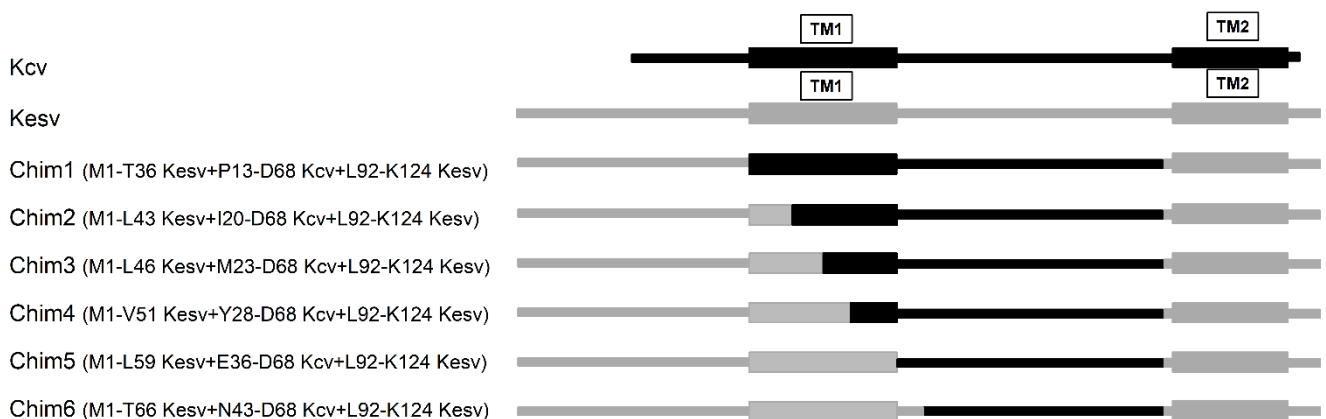


Abbildung 3.6.1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Kcv-Kesv-Chimären 1 - 6.

Kcv und seine Anteile der Chim1 - Chim6 sind schwarz gekennzeichnet. Kesv und seine Anteile der Chim1 - Chim6 sind grau gekennzeichnet.

Es wurden qualitative Lokalisationsstudien der sechs Kcv-Kesv-Chimären von Chappuis (2013) durchgeführt. Diese Studien zeigen, dass Chim1 – 3, ähnlich Kcv, in das ER sortiert werden, wohingegen Chim4 - 6 sich wie Kesv verhalten und bei Expression in HEK293-Zellen in den Mitochondrien lokalisiert sind. Ähnlich wie Kesv zeigen auch Chim4 - 6 eine hohe cytosolische Hintergrundfluoreszenz (Chappuis, 2013).

Der abrupte Wechsel zwischen der Sortierung ins ER und der Sortierung in die Mitochondrien zwischen Chim3 und Chim4 wurde im Folgenden stärker in den Fokus gerückt. Da sich Chim3 (Kcv: M23-D68) und Chim4 (Kcv: Y28-D68) lediglich in fünf Aminosäuren unterscheiden (MFVMI → ILLVV), liegt es nahe, dass jene unabdingbar für die ER-Sortierung von Kcv und somit Teil einer Signalsequenz sind. Ist diese Signalsequenz nicht mehr vollständig, wie im Falle von Chim4, übernimmt der von Kesv vorgegebene Sortierungsweg die dominierende Rolle. Besonders herauszustellen ist hierbei die zentrale Position dieser putativen Signalsequenz, da bis dato bekannte Signalsequenzen meist C- oder N-terminal liegen (Munro & Pelham, 1987; Walter & Blobel, 1980). Um die Rolle der kurzen Aminosäureabfolge MFVMI von Kcv näher zu untersuchen, wurden von Chappuis (2013) vier weitere Chimären erstellt, bei denen schrittweise Aminosäure für Aminosäure der Kcv-Anteil in Kesv umgewandelt wurde. Die so designten Chimären Chim3.1-Chim3.4 sind mit ihrem kritischen Wechsel zwischen Kesv und Kcv in **Abbildung 3.6.2** dargestellt.

Chim3	(S37-L46Kesv + M23-F35 Kcv)	...SLVGGILSNLMFVMIYKFFPGGF...
Chim3.1	(S37-I47Kesv + F24-F35 Kcv)	...SLVGGILSNLIFVMIYKFFPGGF...
Chim3.2	(S37-L48Kesv + V25-F35 Kcv)	...SLVGGILSNLILLMIYKFFPGGF...
Chim3.3	(S37-L49Kesv + M26-F35 Kcv)	...SLVGGILSNLILLMIYKFFPGGF...
Chim3.4	(S37-V50Kesv + I27-F35 Kcv)	...SLVGGILSNLILLVIYKFFPGGF...
Chim4	(S37-V51Kesv + Y28-F35 Kcv)	...SLVGGILSNLILLVYKFFPGGF...

Abbildung 3.6.2: Aminosäuresequenz-Design der ersten TMD der Chimären Chim3 - Chim4.

Grau hinterlegt ist der abnehmende Kcv-Anteil der Aminosäuresequenz bei den Chim3 - Chim4.

Rot markiert ist der zunehmende Kesv-Anteil der Aminosäuresequenz bei den Chim3 - Chim4.

Die qualitative Untersuchung der Chimären Chim3.1-Chim3.4 ergaben, dass Chim3.1 - Chim3.3 ähnlich wie Chim3 in den sekretorischen Weg sortiert werden, wohingegen bei Chim3.4 das eGFP-Signal flächig in der Zelle vorliegt und somit keine spezifische Sortierung festgestellt werden konnte (Chappuis, 2013). Bemerkenswert ist hier, dass Chim3.4 bei Koexpression der Markerproteine KDEL::mKate2 und COXVIII::mKate2 dem jeweiligen Markerprotein in sein Ziel-Zellkompartiment folgt und somit auch im ER oder den Mitochondrien lokalisiert vorliegen kann.

3.6.2. Statistische Analyse der Chim3.3, Chim3.4 und Chim4 und ihrer codonoptimierten Version

Die in 3.6 beschriebenen Chimären Chim3.3, Chim3.4 und Chim4 unterscheiden sich jeweils nur in einer Aminosäure durch den abnehmenden Anteil der putativen Signalsequenz (MFVMI) von Kcv. Chim3.3, mit dem größten Anteil der Signalsequenz (XXXMI), wird, wie Chim3, in das ER sortiert. Bei Chim4 ist die Signalsequenz vollkommen durch die entsprechenden AS von Kesv ersetzt, weswegen

das Sortierungssignal von Kesv dominiert und diese Chimäre in den Mitochondrien lokalisiert ist. Im Falle von Chim3.4 ist anzunehmen, dass die einzelne AS der Signalsequenz (XXXXI) nicht für eine Sortierung ins ER ausreicht, die Signalsequenzen von Kesv jedoch auch nicht greifen. Das Sortierungssignal scheint so destabilisiert zu sein, dass die Chimäre schlussendlich unsortiert im Cytosol verbleibt.

Im Falle ihrer Ausgangskonstrukte, Kcv und Kesv, hat die Optimierung der Codone auf humane Expressionssysteme die Stärkung des Hauptsortierungsweges zur Folge. Nun ist es von gesteigertem Interesse, welche Folge die Codonoptimierung auf die Signalsequenzen der kritischen Chimären Chim3.3, Chim3.4 und Chim4 hat, bei denen durch minimale Sequenzunterschiede maximale Sortierungsunterschiede auftreten.

Im Zuge dessen wurden die Wildtyp-Chimären Chim3.3, Chim3.4 und Chim4 erneut, und ihre codonoptimierten Versionen Chim3.3_{opt}, Chim3.4_{opt} und Chim4_{opt} primär mikroskopisch betrachtet.

Für Chim3.3::eGFP zeigt sich hierbei eine Sortierung in zwei Ausprägungen (siehe **Abbildung 3.6.3**). Zum einen liegt das eGFP-Signal, wie von Chappuis (2013) beschrieben, in einer netzartigen, den Nukleus als Ring umschließenden Struktur vor, die mit dem ER-ständigen Markerprotein KDEL::mCherry kolokalisiert (siehe **Abbildung 3.6.3**). Zum anderen liegt Chim3.3::eGFP in manchen Zellen jedoch auch unsortiert, ohne auszumachende spezifische Sortierung vor, die auch nicht mit dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry kolokalisiert (siehe **Abbildung 3.6.3**).

Chim3.3_{opt}::eGFP liegt hingegen in punktuellen Strukturen akkumuliert vor, die mit COXVIII::mCherry kolokalisieren und somit auf eine Sortierung in die Mitochondrien schließen lassen (siehe **Abbildung 3.6.3**).

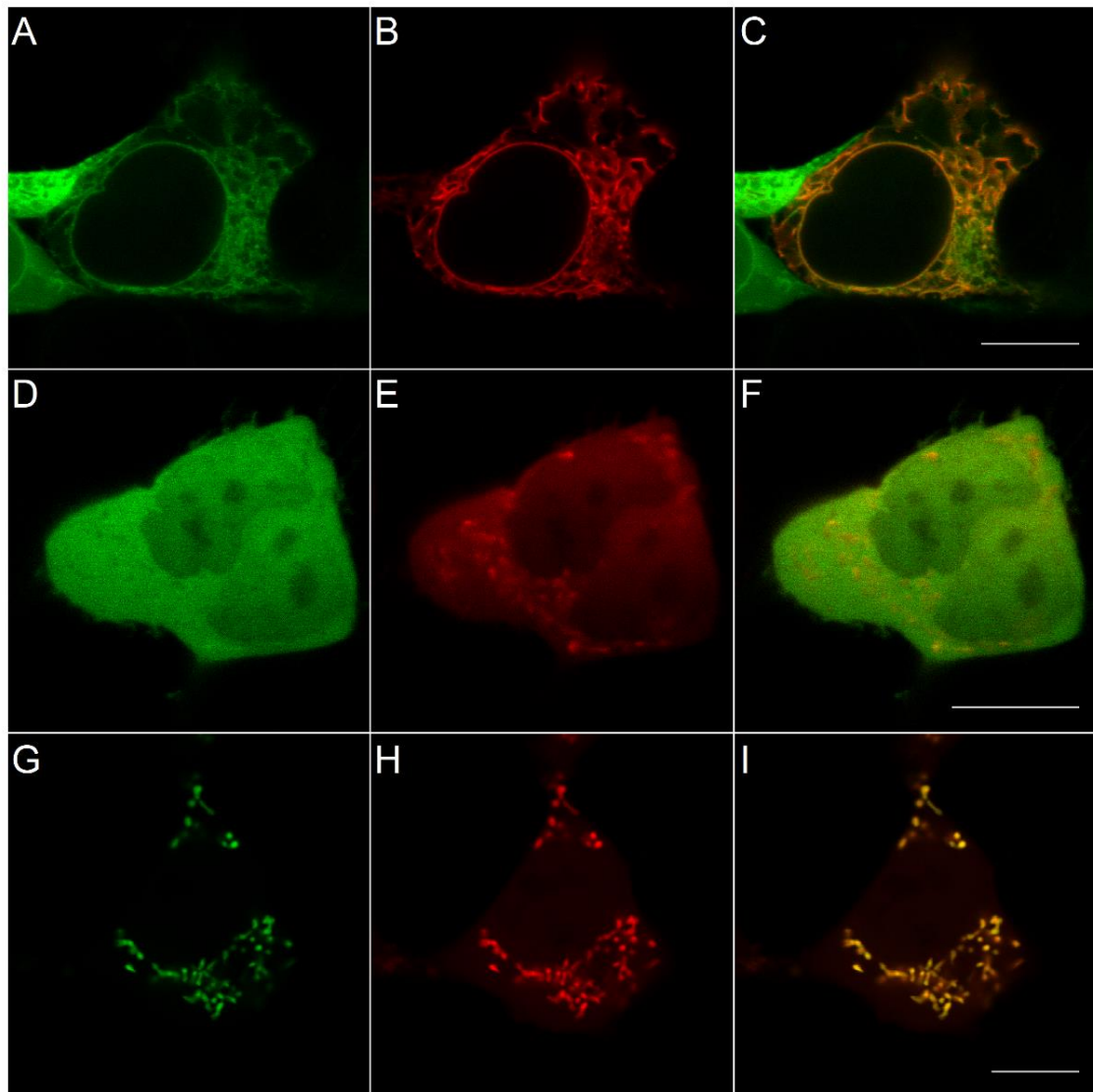


Abbildung 3.6.3: Lokalisation von Chim3.3::eGFP und Chim3.3_{opt}::eGFP

CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit Chim3.3::eGFP und entweder mit COXVIII::mCherry oder KDEL::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt Chim3.3::eGFP im ER lokalisiert, (B) die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein KDEL::mCherry und (C) das *Overlay* beider Kanäle. (D) zeigt Chim3.3::eGFP unsortiert, (E) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (F) das *Overlay* beider Kanäle. (G) zeigt Chim3.3_{opt}::eGFP in den Mitochondrien akkumuliert, (H) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (I) das *Overlay* der beiden Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

Chim3.4::eGFP (A) liegt bei der erneuten Primärbetrachtung sowohl mit, als auch ohne co-Transfektion mit den Markerproteinen KDEL::mCherry und COXVIII::mCherry (B) flächig ohne spezifische Struktur in den Zellen vor (siehe **Abbildung 3.6.4**).

Chim3.4_{opt}::eGFP (D) hingegen liegt, wie in **Abbildung 3.6.4** zu sehen, in den Mitochondrien lokalisiert vor. Ein Eindruck, der durch die Kolokalisation mit dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry (E) bestätigt wird.

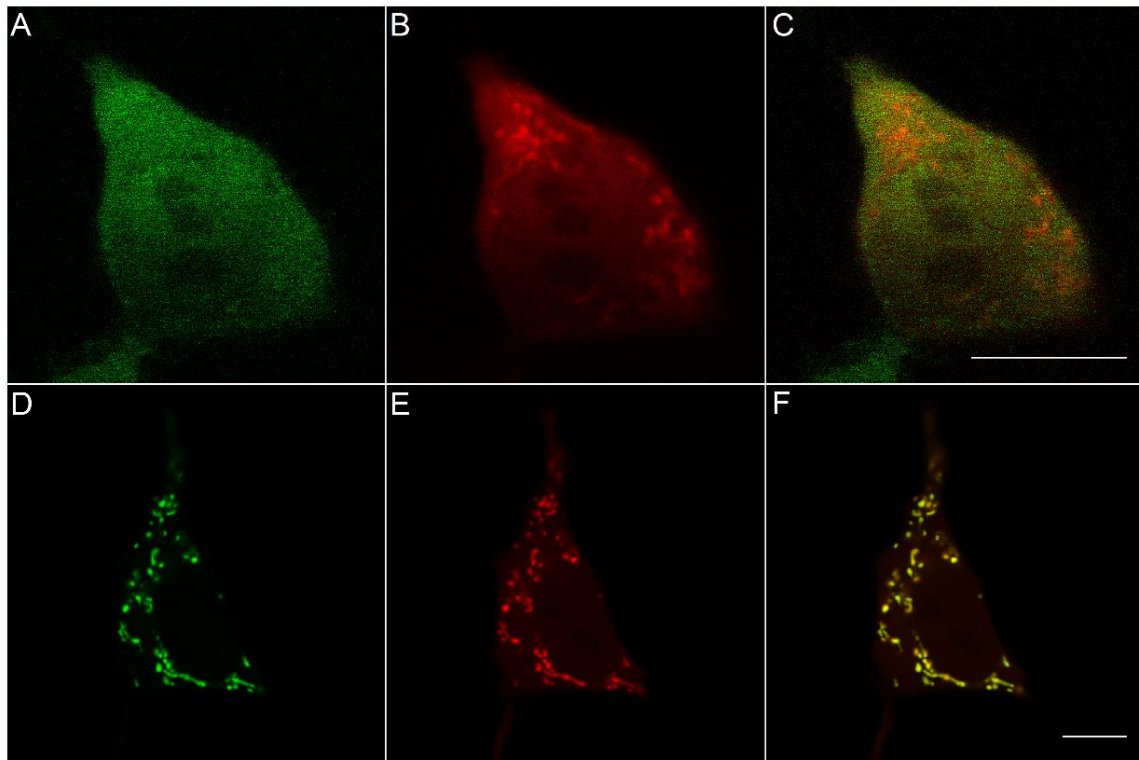


Abbildung 3.6.4: Lokalisation von Chim3.4::eGFP und Chim3.4_{opt}::eGFP

CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit Chim3.4::eGFP und mit COXVIII::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt Chim3.4::eGFP unsortiert, (B) die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (C) das *Overlay* beider Kanäle. (D) zeigt Chim3.4_{opt}::eGFP mitochondrial sortiert, (E) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (F) das *Overlay* beider Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

Chim4::eGFP liegt bei einer Expression in HEK293-Zellen wie in **Abbildung 3.6.5** dargestellt vor. Einerseits akkumuliert Chim4::eGFP wie in (A) zu sehen in den Mitochondrien und zeigt eine hohe Deckungsgleichheit mit dem mCherry-Signal (B) des mitochondrialen Markerproteins. Andererseits zeigt sich Chim4::eGFP in manchen HEK293-Zellen flächig, ohne spezifische Struktur (D), die nicht mit COXVIII::mCherry (E) kolokalisiert.

Chim4_{opt}::eGFP hingegen weist in allen Fällen eine punktuelle Struktur (F) auf, die mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry (G) kolokalisiert und somit untermauert, dass Chim4_{opt}::eGFP in die Mitochondrien sortiert wird.

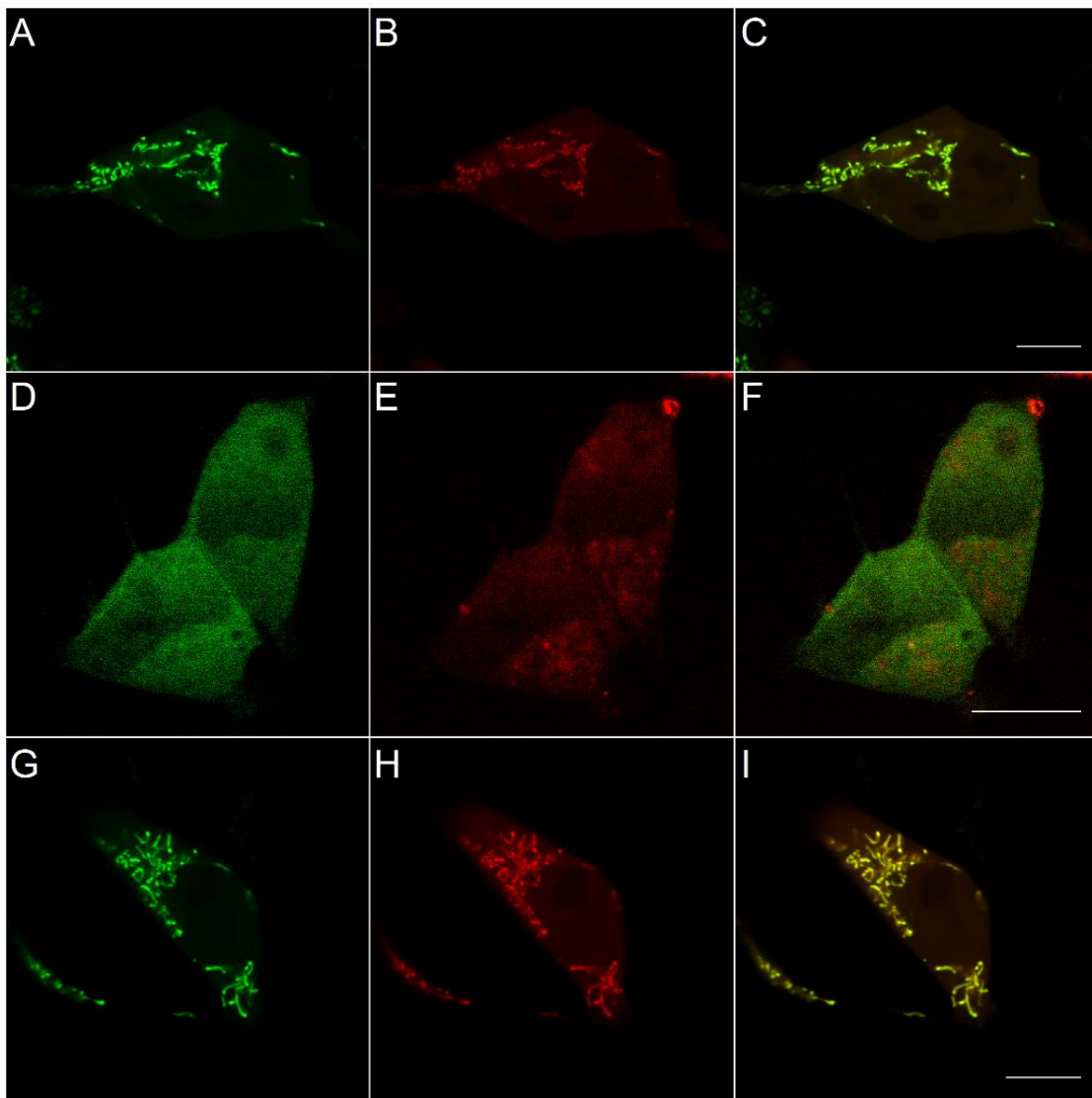


Abbildung 3.6.5: Lokalisation von Chim4::eGFP und Chim4_{opt}::eGFP

CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit Chim4::eGFP und mit COXVIII::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt Chim4::eGFP mitochondrial sortiert, (B) die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (C) das *Overlay* beider Kanäle. (D) zeigt Chim4::eGFP unsortiert, (E) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (F) das *Overlay* beider Kanäle. (G) zeigt Chim4_{opt}::eGFP mitochondrial sortiert, (H) die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (I) das *Overlay* beider Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 μm .

Nach der mikroskopischen Primärbetrachtung folgte sowohl für die Wildtyp Kcv-Kesv-Chimären Chim3.3, Chim3.4 und Chim4 als auch für die codonoptimierten Varianten Chim3.3_{opt}, Chim3.4_{opt} und Chim4_{opt} eine quantitative Untersuchung der Verteilung der Sortierungspopulationen der jeweiligen Chimären, die in **Abbildung 3.6.6** vergleichend dargestellt ist.

- Chim3.3 liegt bei $n=125$ betrachteten Zellen zu 94 % im ER und in 6 % der Zellen unsortiert vor.

- Chim3.3_{opt} weist bei n=123 HEK293-Zellen zwei Sortierungspopulationen auf, deren prozentuale Sortierungsverteilung wie folgt ist: mitochondrialsortiert lagen 99 % und als unsortiert kategorisiert lagen 1 % der Zellen vor.
- Chim3.4 ist in n=134 Chim3.4::eGFP exprimierenden HEK293-Zellen zu 100 % der Fälle unsortiert.
- Chim3.4_{opt} hingegen liegt bei n=123 betrachteten Zellen zu 100 % mitochondrialsortiert vor.
- Chim4 zeigt in n=105 Zellen zwei Populationen. Beim Hauptanteil der Zellen (97 %) liegt Chim4 unstrukturiert vor und ist somit in diesen Fällen als „unsortiert“ zu kategorisieren. Die restlichen 3 % der Zellen zeigen eine klare Akkumulation des eGFP-Signals in den Mitochondrien.
- Chim4_{opt} ist in 100 % der n=131 Zellen in den Mitochondrien lokalisiert.

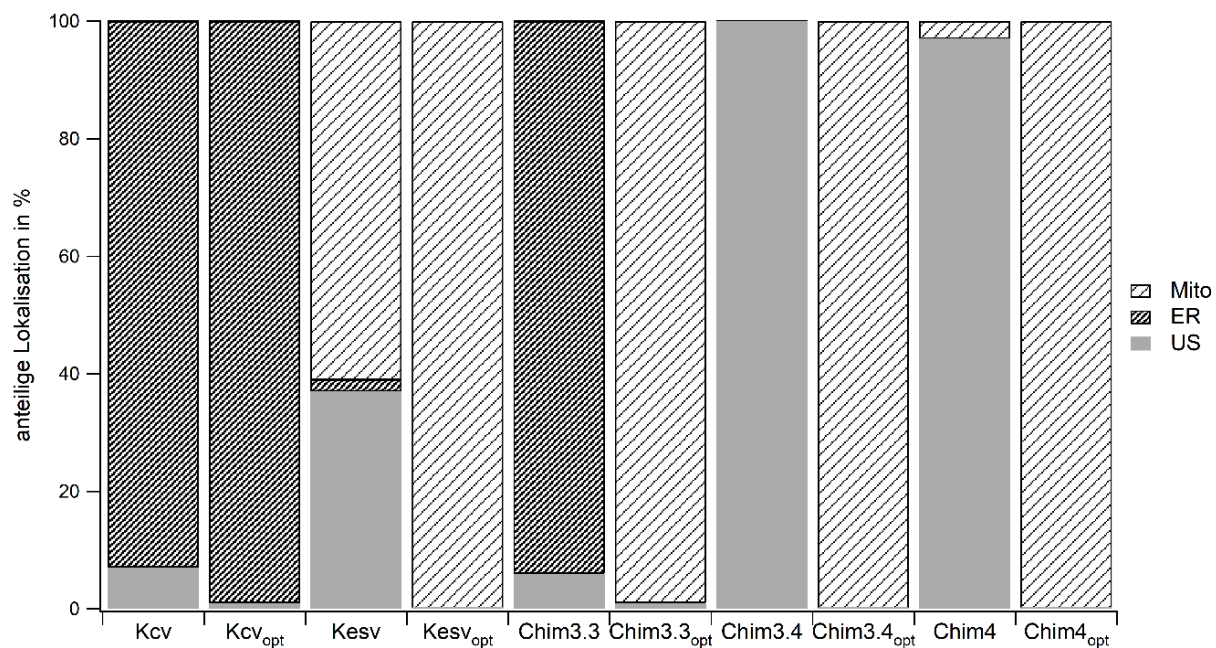


Abbildung 3.6.6: Prozentuale Sortierungsverteilung der Chimären Chim3.3_{opt} - Chim4_{opt} im Vergleich zu ihrem jeweiligen Wildtyp

Dargestellt ist die anteilige Lokalisation in Prozent von Kcv (n=110)/Kcv_{opt} (n=145) und Kesv (n=259)/Kesv_{opt} (n=135) im Vergleich zu den Kcv-Kesv-Chimären: Chim3.3 (n=125)/Chim3.3_{opt} (n=123), Chim3.4 (n=134)/Chim3.4_{opt} (n=123) und Chim4 (n=105)/Chim4_{opt} (n=131). Die betrachteten Zellen wurden kategorisiert als unsortiert (US), mitochondrial- (Mito) und ER- sortiert (ER).

Bei der quantitativen Untersuchung der Kcv-Kesv-Chimären stellt sich heraus, dass die Codonoptimierung in ihrem Fall nicht zwingend zu einer Stärkung des Hauptsortierungsweges führt. Im Gegenteil: Bei allen drei Chimären kommt es, unabhängig von ihrer vorherigen Sortierung, durch die Erhöhung der Translationsgeschwindigkeit über das gesamte Gen hinweg zu einer deutlich bevorzugten Sortierung in die Mitochondrien. Dies entspricht am ehesten der gesteigerten Sortierungseffizienz von Kesv im Vergleich mit Kesv_{opt}. Obgleich es auch im Falle von Kcv_{opt} zu einer leicht gesteigerten

Sortierungseffizienz in den Hauptsortierungsweg kommt, so ist diese doch größenordnungsmäßig nicht mit der von Kesv zu vergleichen. Die aus den codonoptimierten Kcv-Kesv-Chimären gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Codonoptimierung die Sortierung von Kesv deutlich stärker tangiert als Kcv. Besonders auffällig ist hierbei der Sortierungswechsel von Chim3.3. Hier kommt es durch die optimierte Expression zu einer vollkommenen Umrekrutierung von einem fast vollkommen ER-lokaliserten zu einem quasi vollkommen mitochondrialsortierten Konstrukt. Im Hinblick auf Chim3.4 und Chim4 kommt es weniger zu einem kompletten Wechsel der Sortierung, sondern voraussichtlich eher zu einer Steigerung bzw. Findung des vorbestimmten Sortierungsweges in die Mitochondrien. Aufgrund dieser Beobachtung lässt sich spekulieren, dass die Effizienz der zuvor dominanten Signalsequenz von Kcv durch die Codonoptimierung eher vermindert bzw. zumindest nicht erhöht wird, wohingegen die ursprünglich schwächeren Sortierungssignale von Kesv klar gestärkt werden.

3.6.3. Chim3.3_{26/68opt}/Chim3.3_{opt26/68wt}

Die zuvor geäußerte Vermutung, dass die Codonoptimierung den Hauptsortierungsweg von Kcv nicht gleichwertig wie den Hauptsortierungsweg von Kesv unterstützt, wird im Folgenden näher betrachtet. Hierfür wurde die Chim3.3, die durch die Codonoptimierung den deutlichsten Sortierungswegwechsel erfährt, stärker in den Fokus gerückt und differenzierter untersucht. Da Chim3.3 als Wildtyp, ähnlich wie Kcv, bevorzugt in den sekretorischen Weg sortiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass hier die Signalsequenz von Kcv (XXXMI) die Sortierung bestimmt. Chim3.3_{opt} hingegen ist hauptteilig mitochondrial sortiert, weswegen hier davon auszugehen ist, dass durch die Codonoptimierung die von Kesv_{opt} codierten Sortierungssignale dominieren.

Auf dieser Hypothese aufbauend wurden zwei weitere Chimären erstellt:

- Chim3.3_{26-68opt}: Der Kesv-Anteil entspricht hier dem Kesv-Wildtyp, der Kcv-Anteil (M26-D68) hingegen ist codonoptimiert.
- Chim3.3_{opt26-68wt}: Der Kesv-Anteil entspricht hier Kesv_{opt}, wohingegen der Kcv-Anteil (M26-D68) dem Kcv-Wildtyp entstammt.

Der schematische Aufbau der neu erstellten Chimären ist **Abbildung 3.6.7** zu entnehmen.

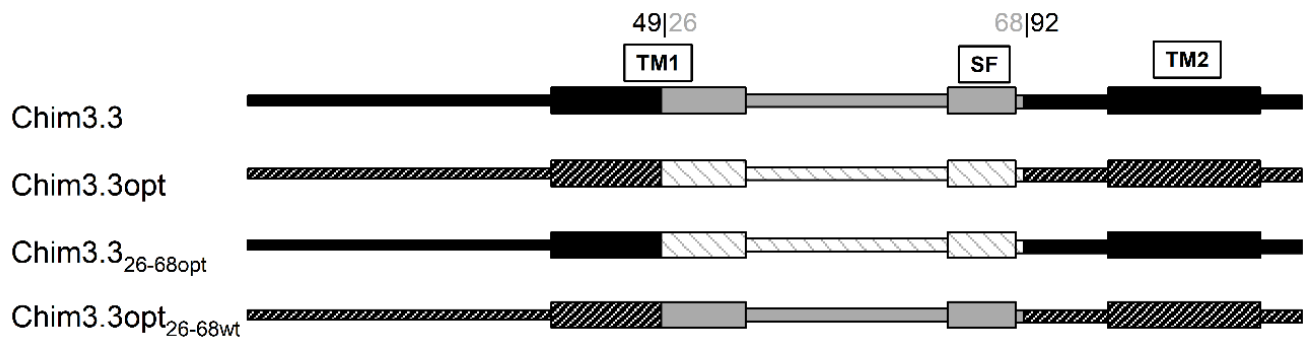


Abbildung 3.6.7: Designschema der neuen Chim3.3-Chimären: Chim3.3_{26-68opt} und Chim3.3opt_{26-68wt}

Der Anteil von Kesv (M1-L49+L92-K124) ist schwarz, der gleiche Anteil an Kesv_{opt} ist hingegen als schwarzgestreift dargestellt. Der Anteil von Kcv (M26-D68) ist als grau, der gleiche Anteil an Kcv_{opt} hingegen als graugestreift gezeigt.

Die folgende Darstellung wurde wie unter **Absatz 3.2.3** beschrieben erstellt und zeigt den Verlauf der *codon-usage* entlang der Gensequenz von Chim3.3_{26-68opt} und Chim3.3opt_{26-68wt} im Vergleich (siehe **Abbildung 3.6.8**). Diese Darstellungsart visualisiert deutlich den Anstieg bzw. Abfall der *codon usage* in den codonoptimierten bzw. natürlich gewählten Bereichen der Chimären. Der CU-Verlauf ist im Vergleich mit den Positionen der Kanalsequenzwechsel in der Gensequenz nach vorne verschoben, was auf das bereits in **Absatz 3.2.3** beschriebene Betrachtungsfenster von 18 AS zurückzuführen ist.

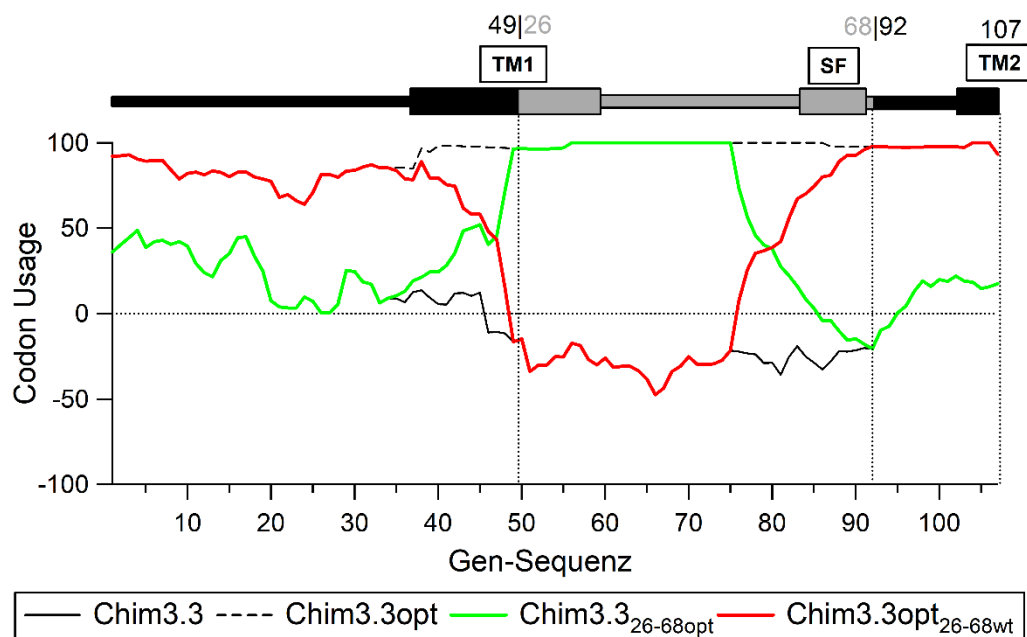


Abbildung 3.6.8: Verlauf der *codon usage* entlang der Gen-Sequenz von Chim3.3, Chim3.3_{opt}, Chim3.3_{26-68opt} und Chim3.3opt_{26-68wt}

Der Kurvenverlauf der *codon usage* entlang der Gen-Sequenz spiegelt die natürliche und gezielt-optimierte Auswahl der Codone im Verlauf der Chimären aus Kesv/Kesv_{opt} und Kcv/Kcv_{opt} wider.

Die mikroskopische Primärbetrachtung von Chim3.3_{26-68opt}::eGFP ergab, dass diese Chimäre im Gegensatz zu Chim3.3::eGFP und Chim3.3_{opt}::eGFP zwei Ausprägungen gezielter Sortierung hat. **Abbildung 3.6.9** (A) zeigt exemplarisch eine Chim3.3_{26-68opt}::eGFP exprimierende HEK293-Zelle, bei der das eGFP-Signal mit dem mitochondrialen Markerprotein (B) kolokalisiert (C), und Chim3.3_{26-68opt} somit in den Mitochondrien lokalisiert ist. Die in **Abbildung 3.6.9** (D) und (G) gezeigten Zellen tragen beide Chim3.3_{26-68opt}::eGFP sowohl in punktuellen als auch in netzartigen, den Zellkern umfassenden Strukturen. Der Vergleich mit den Markerproteinen COXVIII::mCherry und KDEL::mCherry (siehe **Abbildung 3.6.9** (E) und (H)) legt nahe, dass Chim3.3_{26-68opt}::eGFP in diesen Zellen in beiden Zellkompartimenten vertreten ist.

Für Chim3.3_{opt26-68wt} ergab die mikroskopische Primärbetrachtung ein noch diverseres Bild. Chim3.3_{opt26-68wt} zeigt sich, bei Expression in HEK293-Zellen, in vier verschiedenen Sortierungsausprägungen. Wie bei Chim3.3_{26-68opt}::eGFP wird auch Chim3.3_{opt26-68wt}::eGFP in die Mitochondrien sortiert (siehe **Abbildung 3.6.10** (A)) und kolokalisiert mit COXVIII::mCherry (B). Zudem tritt Chim3.3_{opt26-68wt}, genau wie Chim3.3_{26-68opt}, gleichzeitig in einer Zelle sowohl in den Mitochondrien als auch im ER auf. Diesen Zustand zeigen beispielhaft die Chim3.3_{opt26-68wt} exprimierenden Zellen (G) und (J) in **Abbildung 3.6.10** im Vergleich mit den mitochondrialen (H) und dem ER-spezifischen (K) Markerprotein. Neben den bereits bei Chim3.3_{26-68opt} gesehenen Sortierungsausprägungen liegt Chim3.3_{opt26-68wt} jedoch zum einen in manchen Zellen ausschließlich im ER vor, und zum anderen liegt in manchen Zellen das eGFP-Signal flächig über die Zelle verteilt vor und lässt keine Sortierung erkennen (siehe **Abbildung 3.6.10** (D) und (M)).

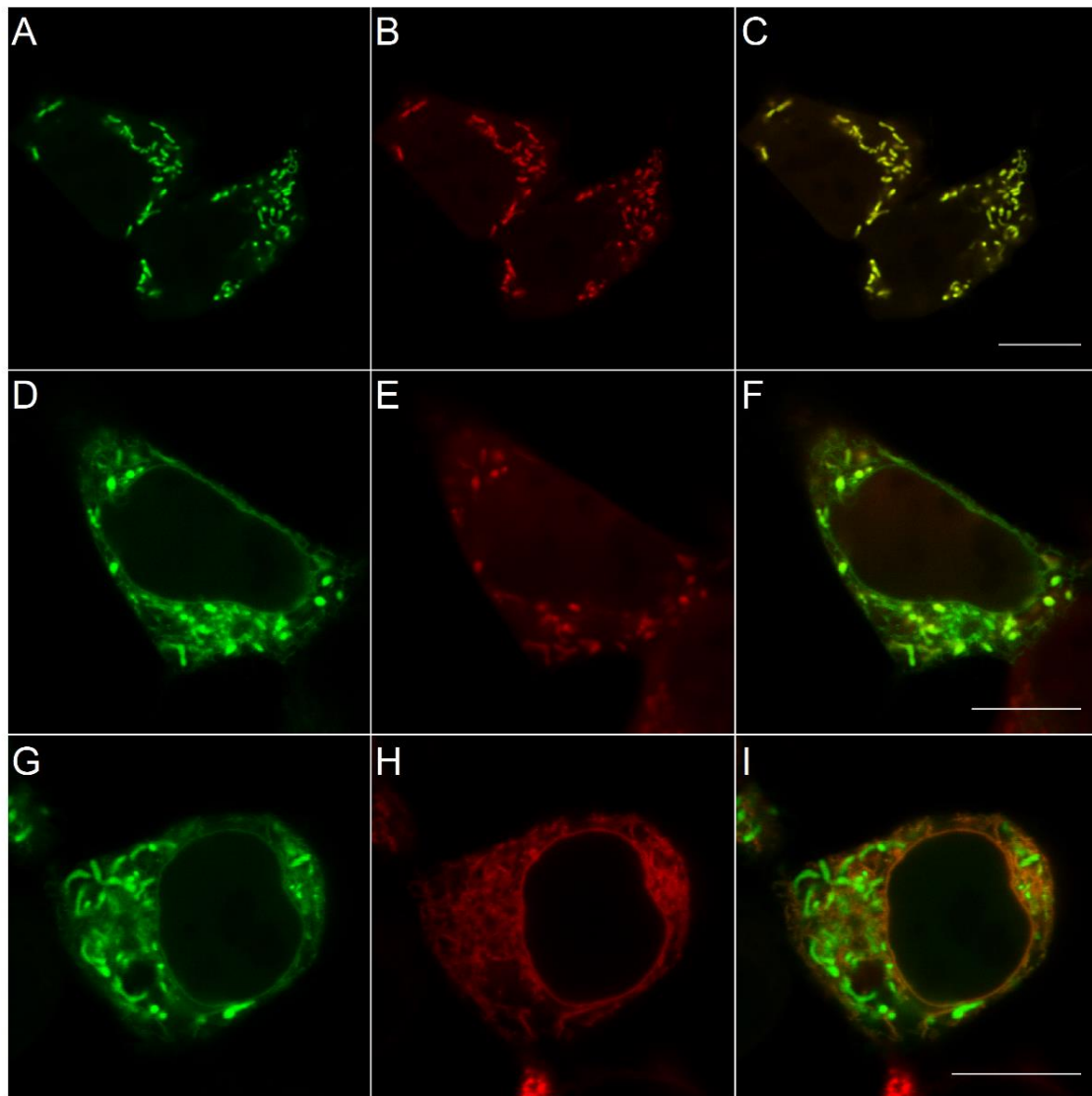
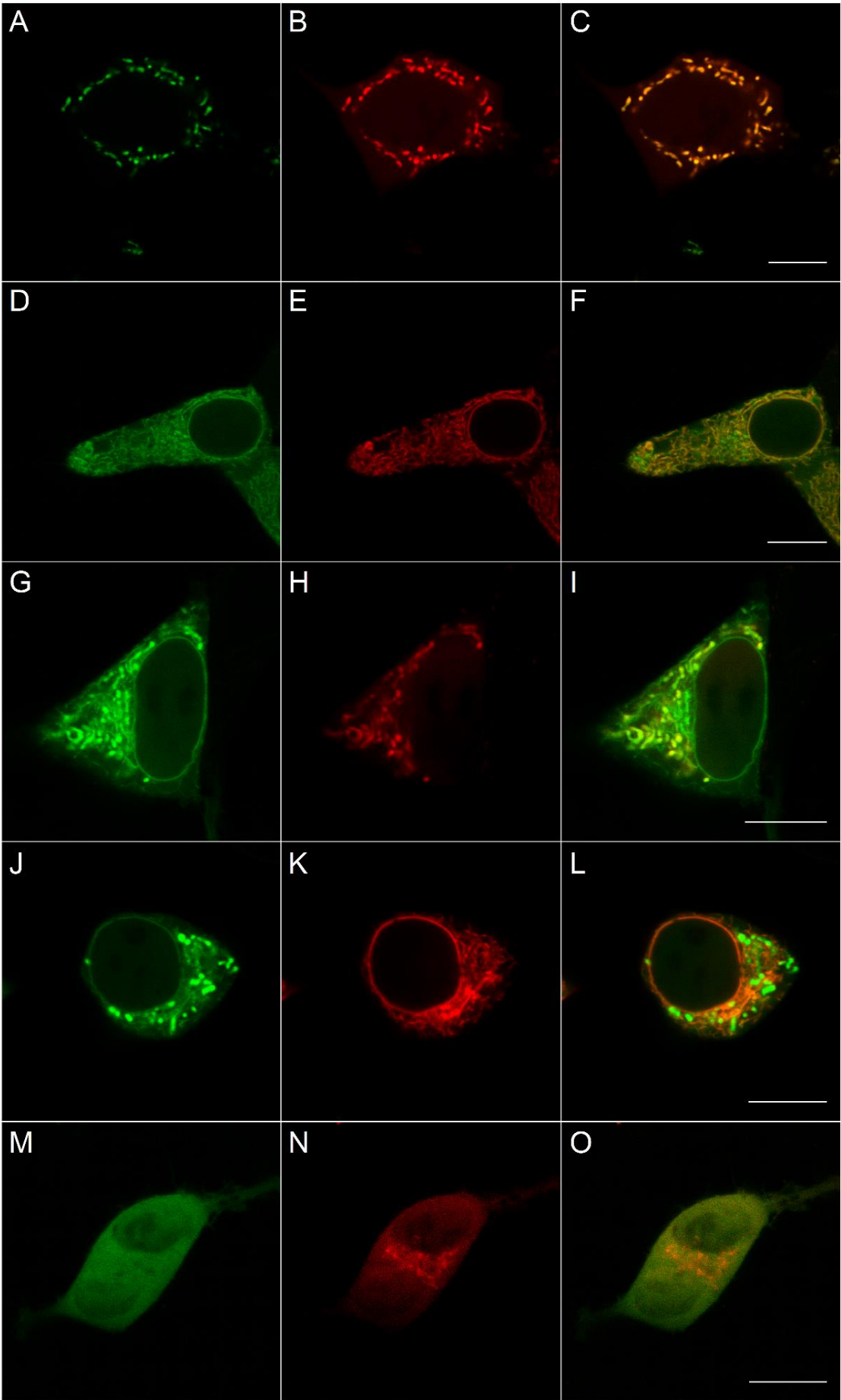


Abbildung 3.6.9: Lokalisation von Chim3.3_{26-68opt}

CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit Chim3.3_{26-68opt}::eGFP und entweder mit COXVIII::mCherry oder KDEL::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt Chim3.3_{26-68opt}::eGFP mitochondrial. (B) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (C) das *Overlay* beider Kanäle. (D) zeigt Chim3.3_{26-68opt}::eGFP „Mito+ER“ sortiert, (E) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (F) das *Overlay* beider Kanäle. (G) zeigt Chim3.3_{26-68opt}::eGFP „Mito+ER“ sortiert, (H) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein KDEL::mCherry und (I) das *Overlay* beider Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

Abbildung 3.6.10 auf der folgenden Seite: Lokalisation von Chim3.3opt_{26-68wt}

CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit Chim3.3opt_{26-68wt}::eGFP und entweder mit COXVIII::mCherry oder KDEL::mCherry transient co-transfiziert wurden. (A) zeigt Chim3.3opt_{26-68wt}::eGFP mitochondrial und (M) unsortiert. (B) bzw. (N) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein COXVIII::mCherry und (C) bzw. (O) das *Overlay* beider Kanäle. (D) zeigt Chim3.3opt_{26-68wt}::eGFP ER sortiert, (E) zeigt die entsprechende Zelle mit dem Markerprotein KDEL::mCherry und (F) das *Overlay* beider Kanäle. (G) bzw. (J) zeigt Chim3.3opt_{26-68wt}::eGFP sowohl in Mitochondrien als auch ER in derselben Zelle lokalisiert. (H) zeigt die entsprechende Zelle aus (G) mit dem mitochondrialen Markerprotein COXVIII::mCherry und (K) die entsprechende Zelle aus (J) mit dem ER-Markerprotein KDEL::mCherry. (I) und (L) zeigen die entsprechenden *Overlays* der beiden Kanäle. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.



Der mikroskopischen Primärbetrachtung schloss sich auch hier die quantitative Bestimmung der Sortierungspopulationsverteilung an. Diese ist für Chim3.3_{26-68opt} und Chim3.3opt_{26-68wt} in **Abbildung 3.6.11** gegen Chim3.3 und Chim3.3_{opt} aufgetragen.

Im Falle von Chim3.3_{26-68opt} wurden n=246 HEK293-Zellen aufgenommen und eingeordnet, wobei 77 % als „Mito“ und 23 % als „Mito+ER“ kategorisiert wurden.

Bei n=230 Chim3.3opt_{26-68wt} exprimierenden HEK293-Zellen sind 35 % mitochondrial sortiert, in 22 % liegt Chim3.3opt_{26-68wt} im ER lokalisiert vor, 41 % der Zellen sind als „Mito+ER“ einzuordnen und bei 2 % ist keine klare Struktur zu erkennen.

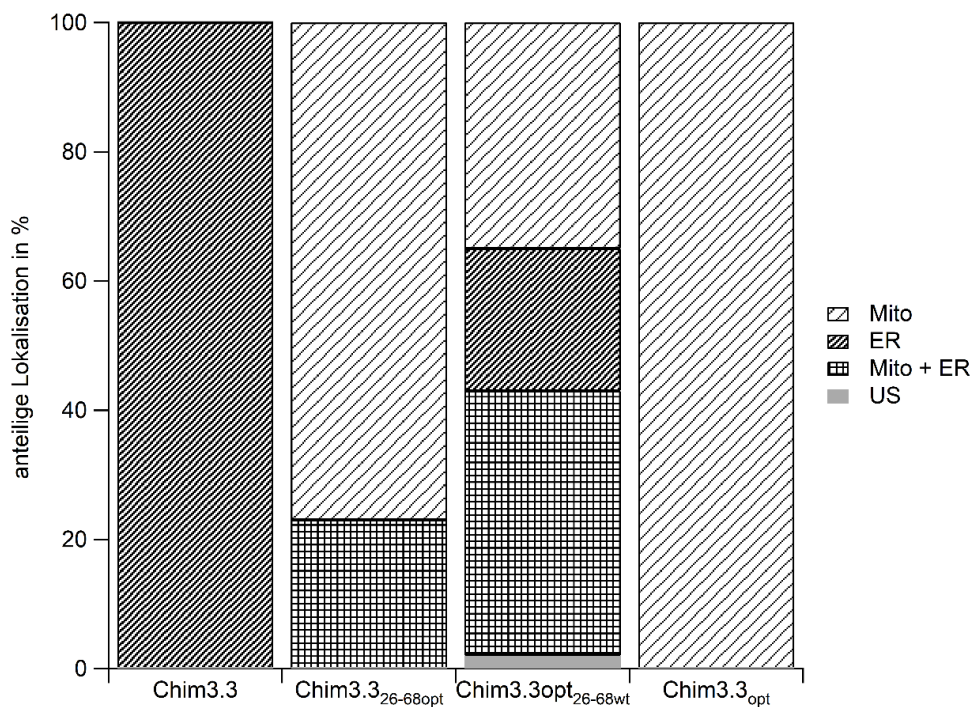


Abbildung 3.6.11: Prozentuale Sortierungsverteilung der Chimären Chim3.3_{26-68opt} und Chim3.3opt_{26-68wt} im Vergleich zu Chim3.3 und Chim3.3_{opt}

Dargestellt ist die anteilige Lokalisation in Prozent von den Kcv-Kesv-Chimären: Chim3.3 (n=125)/ Chim3.3_{opt} (n=123) im Vergleich mit den Chimären Chim3.3_{26-68opt} (n=246) und Chim3.3opt_{26-68wt} (n=230). Die betrachteten Zellen wurden kategorisiert als unsortiert (US), mitochondrial- (Mito), ER- sortiert (ER) und als sowohl in den Mitochondrien als auch dem ER lokalisiert (Mito+ER).

Die aus der quantitativen Untersuchung der Chim3.3_{26-68opt} und Chim3.3opt_{26-68wt} erworbenen Ergebnisse lassen sich wie folgt interpretieren:

Nimmt man eine ER-Sortierung als Indiz für die Dominanz der Kcv-Signalsequenz und eine Sortierung in die Mitochondrien als Indiz für eine über Kesv gelenkte Sortierung, kann anhand der Sortierungspopulationsverteilung eine Hierarchie der Sortierungssignale abgeleitet werden.

Geht man davon aus, dass bei Chim3.3 die von Kcv gegebene Signalsequenz dominiert, so kann man annehmen, dass diese stärker ist als das von Kesv codierte Sortierungssignal. Die Codonoptimierung von

Chim3.3 zu Chim3.3_{opt} über die gesamte Gensequenz hat hingegen die Stärkung des von Kesv codierten Sortierungssignals zur Folge. Möchte man bereits hier eine Hierarchie der Sortierungssignale anlegen, so dominiert $Kcv > Kesv$ jedoch $Kesv_{opt} > Kcv_{opt}$. In welchem Verhältnis stehen jedoch die durch die Wildtypen codierten Sortierungssignale zu ihren codonoptimierten Versionen?

Diese Frage wird hypothetisch durch Chim3.3_{26-68opt} und Chim3.3_{opt26-68wt} beantwortet. Betrachtet man Chim3.3_{26-68opt}, so gewinnt durch die Codonoptimierung des Kcv-Anteils das von Kesv codierte Sortierungssignal deutlich die Überhand. Bei 23 % der Zellen scheint die Sortierungsentscheidung nicht eindeutig zu sein, weshalb es zum dualen *targeting* der Mitochondrien und des ERs kommt. Dies wiederum spricht für die grundsätzliche Funktionalität der Signalsequenz von Kcv_{opt}. Aus den durch Chim3.3_{26-68opt} erworbenen Daten lässt sich folgende Hierarchie der Sortierungssignale ableiten:

$Kesv > Kcv_{opt}$ und somit auch $Kcv > Kcv_{opt}$.

Im Fall von Chim3.3_{opt26-68wt} nimmt der Anteil mitochondrial sortierter Zellen stark ab, trotz des codonoptimierten Sequenz-Anteils von Kesv. Der Anstieg der Zellen, bei denen Chim3.3_{opt26-68wt} entweder ins ER oder in das ER und die Mitochondrien gleichzeitig sortiert wird, spricht für die zunehmende Dominanz der durch Kcv gegebenen Signalsequenz gegenüber Kesv_{opt}. Hier scheinen die jeweiligen Sortierungssignale eine gewisse Balance gefunden zu haben, bei der der Ausgang ca. 50:50 Mitochondrien und ER ist.

Zusammenfassend ergibt sich die folgende spekulative Hierarchie der Sortierungssignale von stärker zu schwächer: $Kcv \approx Kesv_{opt} > Kesv > Kcv_{opt}$.

Das bereits angesprochene Gleichgewicht der Sortierungssignale, das bei Chim3.3_{opt26-68wt} zu einer sehr ambivalenten und dennoch ausgeglichenen Sortierungspopulationsverteilung führt, sollte mittels Temperaturmodulationsversuche näher untersucht werden.

Ziel der Versuchsreihe ist es, über die Modulation der Wachstumstemperatur die Balance der Sortierungssignale möglicherweise zu destabilisieren, wodurch eine Aussage darüber getroffen werden kann, welcher Weg energetisch präferierbar ist.

Im Zuge dessen wurden HEK293-Zellen an fünf verschiedenen Tagen 4 h nach Transfektion mit entweder Chim3.3_{opt} oder Chim3.3_{opt26-68wt} und nach einem Medienwechsel zum CO₂-gepufferten Leibovitz's (1 x) L-15 Medium für mindestens 16 h auf die Versuchstemperaturen 33 °C, 34 °C, 35 °C und 39 °C gesetzt. Zeitgleich wurden an jedem Versuchstag mit Chim3.3_{opt} oder Chim3.3_{opt26-68wt} transfizierte HEK293-Zellen gleichbehandelt und als Kontrolle bei 37 °C bis zur Betrachtung inkubiert. Anschließend wurden je n=100 Zellen mittels CSLM aufgenommen und anhand ihrer Sortierung kategorisiert. Die anteilige Lokalisation in Prozent der verschiedenen Konditionen und Konstrukte ist in **Abbildung 3.6.12** als Balkendiagramm aufgetragen.

Chim3.3_{opt} liegt im Temperaturbereich von 33 - 39 °C vorwiegend wie bei der Standardtemperatur 37 °C in den Mitochondrien lokalisiert vor. Genauer gesagt wird Chim3.3_{opt} bei 33 °C zu 98 %, bei 34 °C zu 100 %, bei 35 °C zu 95 %, bei 37 °C zu 94 % und bei 39 °C zu 100 % der Zellen in die Mitochondrien sortiert. Bei 33 °C, 35 °C und 37 °C ist bei den restlichen 2 %, 5 % und 6 % der betrachteten Zellen keine eindeutige Sortierung festzustellen, da das eGFP-Signal flächig in den Zellen vorliegt. Somit ist im Falle von Chim3.3_{opt} keine Temperaturabhängigkeit des Sortierungsverhaltens festzustellen.

Bei Chim3.3_{opt26-68wt} gestaltet sich das Bild etwas komplizierter. Der Anteil der Zellen, in denen Chim3.3_{opt26-68wt} mitochondrial sortiert vorliegt, überwiegt nicht immer, sondern hat folgende prozentuale Anteile: 33 °C – 25 %, 34 °C – 47 %, 35 °C – 42 %, 37 °C – 30 % und bei 39 °C – 70 %. Wenn nicht der Anteil der „Mito“ kategorisierten Zellen überwiegt, tut es der Anteil ER-sortierter Zellen in folgenden prozentualen Anteilen: 33 °C – 43 %, 34 °C – 23 %, 35 °C – 44 %, 37 °C – 45 % und bei 39 °C – 26 %.

Auffällig ist, dass mit zunehmender Temperatur der Anteil der Zellen, bei denen Chim3.3_{opt26-68wt} in beiden Zellkompartimenten gleichzeitig auftritt, deutlich abnimmt. So ergeben sich für diese Sortierungspopulation folgende prozentuale Anteile: 33 °C – 23 %, 34 °C – 23 %, 35 °C – 10 %, 37 °C – 10 % und bei 39 °C – 0 %. Die restlichen betrachteten Zellen ließen keine gezielte Sortierung von Chim3.3_{opt26-68wt} erkennen und wurden daher als „unsortiert“ eingeordnet. Folgende prozentualen Anteile ergaben sich für jene Kategorie: Bei 33 °C 9 %, bei 34 °C 7 %, bei 35 °C 4 %, bei 37 °C 15 % und bei 39 °C 4 %.

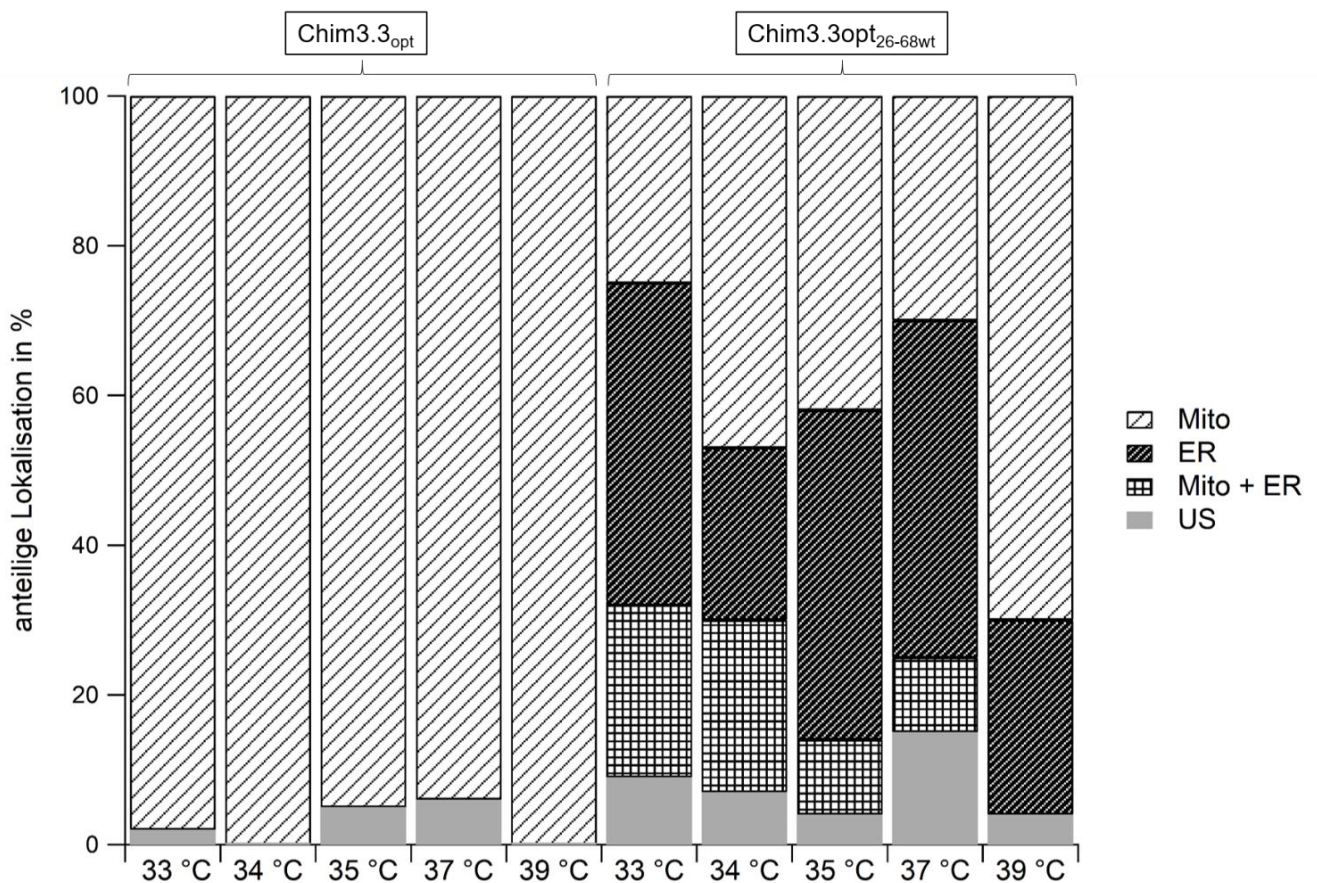


Abbildung 3.6.12: Prozentuale Sortierungsverteilung von Chim3.3_{opt} bzw. Chim3.3_{opt}_{26-68wt} bei 33 °C, 34 °C, 35 °C, 37 °C und 39 °C Wachstumstemperatur

Dargestellt ist die anteilige Lokalisation in Prozent von je n=100 Chim3.3_{opt} oder Chim3.3_{opt}_{26-68wt} exprimierenden HEK293-Zellen bei einer Wachstumstemperatur von 33 °C, 34 °C, 35 °C und 39 °C und n=400 Chim3.3_{opt} oder Chim3.3_{opt}_{26-68wt} exprimierenden HEK293-Zellen bei 37 °C im ER (ER), in den Mitochondrien (Mito), in beiden Kompartimenten gleichzeitig (Mito+ER) und im Cytosol (US).

Die Modulation der Sortierung von Chim3.3_{opt} und Chim3.3_{opt}_{26-68wt} mittels einer Änderung der Wachstumstemperatur zwischen 33 °C und 39 °C ist ein weiteres Indiz für die Stabilität der einen und der Instabilität der anderen Chimäre. So führt weder ein Temperaturabfall, noch ein Anstieg zur Änderung des Sortierungsverhaltens von Chim3.3_{opt}, die Chimäre wird quasi gleichbleibend effektiv in die Mitochondrien sortiert. Dies spricht für die, wie bereits postuliert, starke Dominanz der durch Kesv_{opt} codierten Sortierungssignale in Chim3.3_{opt}.

Wie auch schon bei der bisherigen Standardtemperatur von 37 °C zeigt sich für Chimäre Chim3.3_{opt}_{26-68wt} auch bei den neu gewählten Wachstumstemperaturen ein diverseres Bild der Sortierungspopulationen. Im niedrigen bis optimalen Temperaturbereich 33 - 37 °C scheint auch hier weiterhin eine relative Balance zwischen den von Kesv_{opt} und Kcv codierten Sortierungssignalen zu herrschen; der Anteil der Mitochondrien- und ER-sortierten Zellen hält sich in etwa die Waage.

Erst durch Erhöhung der Wachstumstemperatur auf 39 °C zeigt sich etwas Auffälliges: Mit zunehmender Temperatur steigt der Anteil der Zellen, in denen Chim3.3opt_{26-68wt} in den Mitochondrien lokalisiert ist, eindeutig an. Und es findet sich keine Zellpopulation, bei der Chim3.3opt_{26-68wt} in beiden Kompartimenten, den Mitochondrien und dem ER, gleichzeitig vorliegt. Der durchgängig niedrige Anteil „unsortierter“ Zellen weist zudem auch nicht auf eine gesteigerte Fehl-Prozessierung des Proteins hin. So lässt sich an dieser Stelle spekulieren, dass die Erhöhung der Temperatur gleichsam zu einer gesteigerten Translationsrate über die gesamte Gensequenz hinweg führt und damit, ähnlich wie bei Chim3.3opt, die Sortierung in die Mitochondrien bevorzugt wird. Die Erhöhung des „Mito“-Anteils kann zudem auch über das Verschwinden der „Mito+ER“-sortierten Population erklärt werden.

Im Falle der Zellen, bei denen Chim3.3opt_{26-68wt} in beiden Kompartimenten vorkommt, wurde bislang davon ausgegangen, dass ein quasi perfektes Kräftegleichgewicht zwischen der von Kcv gegebenen Signalsequenz und dem von Kesv_{opt} codierten Sortierungssignal herrscht. Dieses Kräftegleichgewicht scheint durch die Temperaturerhöhung zu Gunsten von Kesv_{opt} verschoben zu sein, so dass ein Protein, das bei 37 °C in das ER sortiert worden wäre, bei 39 °C in die Mitochondrien sortiert wird.

Neben dieser Erkenntnis zeigen die Daten, dass die Sortierung in die Mitochondrien energetisch aufwendiger zu sein scheint und deshalb erst bei höheren Temperaturen der präferierte Weg eines Proteins wird, das zuvor die „Qual der Wahl“ hatte.

4. Fazit und Ausblick

Zunehmend mehr Studien geben Hinweis darauf, dass die Sortierung eines Proteins nicht allein von seiner Aminosäuresequenz und Struktur abhängt. Der Fokus vieler Studien ist zunehmend stärker auf die Rolle der verwendeten Codone, deren tRNA-Verfügbarkeit und der Translationseffizienz in Bezug auf die zelluläre Prozessierung eines Proteins gerichtet. So wird ein Zusammenhang zwischen der gezielten Veränderung der Codonauswahl, der einhergehenden Translations-Geschwindigkeitsänderung und einer Veränderung des Sortierungsschicksals eines Proteins immer deutlicher (Pechmann *et al.*, 2014; Buhr *et al.*, 2016).

Die Erkenntnis, dass die Codonzusammensetzung eines Proteins potenziell als eine zusätzliche regulatorische Ebene bezüglich der Sortierung von Membranproteinen fungieren kann, hat die hier vorgelegte Arbeit großteils motiviert.

Die über die qualitative Untersuchung des Einflusses der Codonoptimierung auf die viralen Ionenkanäle K_{esv} und K_{cv} erhobenen Daten zeigen deutlich, dass in diesem Forschungsfeld noch viele Fragen zur Beantwortung offenstehen.

So konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

- Ein einfaches Protein kann über die Modulation der *codon usage* in den Mitochondrien, dem ER, ohne klare Sortierung im Cytosol oder sogar in derselben Zelle sowohl in den Mitochondrien als auch dem ER lokalisiert sein.
- Für die gezielte Sortierung eines einfachen Proteins ist eine bestimmte Abfolge von optimalen bzw. weniger optimalen Codonen essentiell, wobei hier keine klare Regel oder ein Muster zu bestimmen war.
- Die Sortierung des Proteins und sein Zielkompartiment wird nicht zuletzt von einem bisher nicht definierten Zustand der individuellen Zelle bestimmt und ist somit nicht allein vom Protein und seiner Struktur selbst abhängig.

Der Vergleich des Einflusses der Codonoptimierung von K_{esv} und K_{cv} lässt zwar keine universell anwendbare Regel ableiten, da im einen Fall eine mitochondriale Sortierung und im anderen Fall der Transport ins ER weiterhin bevorzugt wird.

Wie schon Balss (2007) und Chappuis (2013) beobachtet haben, scheint der Transport in die Mitochondrien von K_{esv} generell instabiler zu sein. Diese Ansicht wird durch die Beobachtung, dass ein großer Anteil der K_{esv} exprimierenden Zellen keine klare Sortierung aufweisen, untermauert.

Die Temperaturversuche, die vergleichend zwischen K_{esv} und K_{esv_{opt}} angefertigt wurden, geben zudem Anlass zur Annahme, dass K_{esv} bei energetisch schlechteren Zuständen von den Zellen zunehmend mehr in das ER sortiert wird. Somit kann man im Fall von K_{esv} spekulieren, dass die Zelle den Transport von K_{esv} in das ER, neben der Degradierung des Proteins im Cytosol, als „default“-Ausgang wählt.

Die Codonoptimierung von Kesv ist ein starkes Signal für den mitochondrialen Transport, das über unterschiedlichste Zelltypen hinweg ein homogenes Bild liefert. Die Sortierung von Kesv zeigt sich ohne Codonoptimierung inhomogen und vor allem zelltypabhängig, wohingegen sie durch die Codonoptimierung homogen und zelltypunabhängig wird. An dieser Stelle lässt sich spekulieren, dass dieser Effekt durch die, über alle Zelltypen hinweg, gesteigerte Translationsgeschwindigkeit und somit schnellere Bildung von Kesv_{opt} zu erklären ist.

Dieser Ansatz lässt sich jedoch schwerlich mit der Beobachtung in Einklang bringen, dass Kesv₆ - die Kesv-Kesv_{opt}-Chimäre, bei der lediglich die letzten 14 Aminosäuren codonoptimiert wurden - ähnlich effektiv in die Mitochondrien sortiert wird wie Kesv_{opt}. Interessant wäre es, auch an dieser Stelle die Zelltypabhängigkeit des Sortierungseffekts zu untersuchen. Die zum Teil gegensätzlichen Effekte auf die Sortierung der Kesv-Kesv_{opt}-Chimären verhindern zum jetzigen Zeitpunkt eine einfache und richtunggebende Interpretation der Ergebnisse aus diesem Versuchsteil.

Eine Erkenntnis, die aus der Untersuchung der 30/50-Kesv-Kesv_{opt}-Chimären gezogen werden kann, ist, dass Kesv höchstwahrscheinlich nicht von SRP erkannt und gebunden wird. Somit ist die von Pechmann *et al.* (2014) gemachte Beobachtung, dass ein verlangsames Codon-Cluster 35 - 40 AS *downstream* einer Signalsequenz zu einer verbesserten SRP-Bindung führt, zunächst nicht auf Kesv übertragbar, da Kesv kein eindeutiger SRP-Bindungspartner ist.

Die Untersuchung aller Kesv-Kesv_{opt}-Chimären zeigt zwar, dass das Zielkompartiment von Kesv nicht über eine ganzheitlich beschleunigte Bildung des Proteins moduliert werden kann, es jedoch über die Länge der Aminosäuresequenz sortierungsrelevante Teilbereiche gibt, deren Codonzusammensetzung das Sortierungsschicksal von Kesv stark beeinflussen.

Zudem zeigt die Nutzung unterschiedlichster Sortierungswege von z. B. Chimäre Kesv₁ oder Kesv₄, dass die Sortierung nicht zuletzt mehr von der individuellen Zelle abhängt als vom Protein selbst. Die Ursache, weswegen eine Zelle Kesv₁ in die Mitochondrien und eine andere Zelle Kesv₁ in das ER sortiert, bleibt auf Zellebene unbeantwortet. Die Sortierung von Kesv₁ scheint weitestgehend zellzyklusunabhängig zu sein, wobei sich eine Tendenz ablesen lässt, nach der Zellen in der G1-Phase möglicherweise eine mitochondriale Sortierung von Kesv₁ bevorzugen. Die Erhöhung des Anteils der Zellen, die sich in der G2-Phase befinden, korreliert jedoch mit keiner spezifischen Sortierungspopulation.

Die Sortierung von Kesv₁ scheint zudem auch unabhängig vom metabolischen Status der einzelnen Zelle zu sein. Die Modulation der Glukose-Verfügbarkeit führt zwar zu leichten Schwankungen der Sortierung von Kesv₁ in das ER, jedoch kann durch das gewählte Assay nicht festgestellt werden, wie stark der reale Einfluss der Glukose-Verfügbarkeit auf den metabolischen Status der Zelle ist.

Ein möglicher Weg, die Sortierungsentscheidung der einzelnen Zelle individuell nachzuvollziehen, wäre die Einzelzell-Sequenzierung, da herkömmliche Sequenzierungen in der Regel Durchschnittswerte über

einen ganzen Pool von Zellen liefern und somit die Heterogenität der Zellpopulation nicht widerspiegelt wird. In Einzelzell-Sequenzierungen könnte durch die Analyse des Transkriptoms oder epigenetischer Veränderungen möglicherweise eine Korrelation zwischen dem individuellen Zustand der Zelle und der spezifischen Wahl eines Sortierungswegs für Kcsv₁ oder einer anderen dual sortierten Chimäre aufgedeckt werden.

Aus dieser Arbeit geht hervor, dass an sich stille Mutationen schon in geringem Ausmaß (siehe Kcsv₆) einen großen Einfluss auf die Sortierung von Membranproteinen wie Kcsv und Kcv haben können.

Fåhræus *et al.* (2016) bezeichnen stille Mutationen in der *coding sequence* (CDS) der mRNA, welche die mRNA verändern, jedoch nicht das codierte Peptid, sehr gelungen als „*whisper*“-Mutationen. Sie postulieren, dass der degenerative genetische Code nicht redundant ist und in der CDS der mRNA zusätzliche regulatorische Informationen verankert sind (Fåhræus *et al.*, 2016). So sind bereits jetzt eine Reihe von „*whisper*“-Mutationen und deren Rolle in der Proteinfunktion oder auch bei einigen Krankheiten bekannt. Im Fall von Mukoviszidose etwa, die auf der $\Delta F508$ CFTR-Mutation (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) beruht, wird der Verlauf der Krankheit durch einen stillen Codonaustausch an Stelle I507 (ATC→ATT) deutlich verstärkt (Lazrak *et al.*, 2013).

Die hier gemachte Beobachtung, dass ein als Modellsystem genutzter viraler Ionenkanal in humanen Zellen durch eine alternative *codon usage* in mehreren Kompartimenten auftreten kann, stellt auch in Bezug auf physiologisch essenzielle Ionenkanäle wie den hERG-Kanal (hERG=*human ether-à-go-go related gene*) eine interessante Untersuchungsgrundlage dar. Es sind bereits 500 Mutationen in hERG bekannt, die das angeborene *long-QT syndrome* Typ-2 (LQT2) bedingen (Schwartz *et al.*, 2009).

Ein großer Teil dieser Punktmutationen führt zu einer Veränderung der Kanalfunktion und einer geringeren Kanal-Expression aufgrund einer behinderten ER-Freilassung und verstärkter Degradation des Kanals (Foo *et al.*, 2016). Viele der LQT2 bedingenden Mutationen liegen in der Per-Arnt-Sim (PAS)-Domäne der hERG1a Untereinheit (Foo *et al.*, 2016). Das alternative *trafficking* dieser Gruppe von Mutationen kann durch eine Herabsetzung der Wachstumstemperatur auf 27 °C wieder dem gesunden Wildtyp angepasst werden (Harley *et al.*, 2012). Da virale Ionenkanäle sehr wohl als Modellsysteme für das Verständnis komplexerer humaner Ionenkanäle wie z. B. hERG fungieren können, ist die Tatsache, dass die Nutzung synonymen Codone die Sortierung beeinflusst, auch aus medizinischer Sicht interessant. Das könnte dazu führen, dass in Zukunft möglicherweise verstärkt auch stille Mutationen in ihrer Relevanz reevaluiert werden müssen.

Doch nicht nur aus medizinischer Sicht ist der Einfluss der *codon usage* auf die Sortierung von Proteinen relevant; in der synthetischen Biologie geht der Trend dahin, das Expressionslevel eines Proteins durch Codonoptimierung zu verstärken. In der synthetischen Biologie wird zwar bereits der individuelle *codon usage bias* (ICU) und zum Teil auch die Codon-Umgebung bzw. -Kontext (CC) bei der Generierung

neuer Konstrukte in Betracht gezogen, jedoch scheint eine mögliche Fehlsortierung des Produkts aufgrund einer alternativen *codon usage* noch kein betrachtetes Kriterium zu sein (Chung & Lee, 2012).

5. Literaturverzeichnis

- Abe Y., Shodai T., Muto T., Mihara K., Torii H., Nishikawa S., Endo T., Kohda D.** (2000) *Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20*, Cell, 100(5), 551–560
- Addya S., Anandatheerthavarada H. K., Biswas G., Bhagwat S. V., Mullick J., Avadhani N. G.** (1997) *Targeting of NH₂-terminal-processed microsomal protein to mitochondria: A novel pathway for the biogenesis of hepatic mitochondrial P450MT2*, J. of Cell Biol., 139(3), 589–599
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P.** (2015) *Molecular Biology of the Cell*, 6th Edition, Garland Science, Taylor & Francis Group
- Anandatheerthavarada H. K., Biswas G., Mullick J., Sepuri N. B. V., Otvos L., Pain D., Avadhani N. G.** (1999) *Dual targeting of cytochrome P4502B1 to endoplasmic reticulum and mitochondria involves a novel signal activation by cyclic AMP-dependent phosphorylation at Ser128*, EMBO J., 18(20), 5494–5504
- Arnoult D., Bartle L. M., Skaletskaya A., Poncet D., Zamzami N., Park P. U., Sharpe J., Youle R. J., Goldmacher V. S.** (2004) *Cytomegalovirus cell death suppressor vMIA blocks Bax- but not Bak-mediated apoptosis by binding and sequestering Bax at mitochondria*, PNAS, 101(21), 7988–93
- Balss J.** (2007) *Unterschiedliche zelluläre Sortierung zweier viraler K⁺-Kanäle: Die Bedeutung der zweiten Transmembrandomäne als Sortierungssignal*, Dissertation, Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
- Balss J., Papatheodorou P., Mehmel M., Baumeister D., Hertel B., Delaroque N., Chatelain F. C., Minor D., Van Etten J. L., Rassow J., Moroni A., Thiel G.** (2008) *Transmembrane domain length of viral K⁺ channels is a signal for mitochondria targeting*, PNAS, 105(34), 12313–12318
- Bandlow W., Strobel G., & Schrick R.** (1998) *Influence of N-terminal sequence variation on the sorting of major adenylate kinase to the mitochondrial intermembrane space in yeast*, Biochem. J., 329 Pt 2, 359–367
- Bazzini A. A., del Viso F., Moreno-Mateos M. A., Johnstone T. G., Vejnar C. E., Qin Y., Yao J., Khokha M., Giraldez A. J.** (2016) *Codon identity regulates mRNA stability and translation efficiency during the maternal-to-zygotic transition*, EMBO J., 35(19), 2087–2103
- Beckmann R., Spahn C. M., Eswar N., Helmers J., Penczek P. A., Sali A., Frank J., Blobel G.** (2001). *Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome*, Cell, 107(3), 361–72
- Blobel G., & Dobberstein B.** (1975) *Transfer of proteins across membranes I. Presence of Proteolytically Processed and Unprocessed Nascent Immunoglobulin Light Chains On Membrane-Bound Ribosomes of Murine Myeloma*, J. Cell Biol., 67, 835–851

- Bolte S., & Cordelieres F. P.** (2006). *A guided tour into subcellular colocalisation analysis in light microscopy*, J. Microsc. 224(3), 13–232
- Borgese N., & Fasana E.** (2011). *Targeting pathways of C-tail-anchored proteins*, Biochim. Biophys. Acta, Biomembr., 1808(3), 937–946
- Boukamp P.** (1988) *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line* J. Cell Biol., 106(March), 761–771
- Brambillasca S., Yabal M., Makarow M., & Borgese N.** (2006) *Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers* J. Cell Biol., 175(5), 767–777
- Braun C. J., Lachnit C., Becker P., Henkes L. M., Arrigoni C., Kast S. M., Moroni A., Thiel G., Schroeder I.** (2014) *Viral potassium channels as a robust model system for studies of membrane-protein interaction*, Biochim. Biophys. Acta, Biomembr., 1838(4), 1096–1103
- Buhr F., Jha, S., Thommen M., Mittelstaet J., Kutz F., Schwalbe H., Rodnina M., Komar A. A.** (2016). *Synonymous codons direct cotranslational folding toward different protein conformations* Mol. Cell, 61(3), 341–351
- Chatelain F. C., Gazzarrini S., Fujiwara Y., Arrigoni C., Domigan C., Ferrara G., Pantoja C., Thiel G., Moroni A., Minor D. L.** (2009) *Selection of inhibitor-resistant viral potassium channels identifies a selectivity filter site that affects barium and amantadine block*, PLoS ONE, 4(10)
- Chu D., Kazana E., Bellanger N., Singh T., Tuite M. F., & Von Der Haar T.** (2014) *Translation elongation can control translation initiation on eukaryotic mRNAs*, EMBO J., 33(1), 21–34
- Chung B. K. S., & Lee D. Y.** (2012) *Computational codon optimization of synthetic gene for protein expression*, BMC Systems Biol., 6:134
- Clarke IV T. F., & Clark P. L.** (2008) *Rare codons cluster*, PLoS ONE, 3(10)
- Claros M. G., & Vincens P.** (1996) *Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences*, Eur. J. Biochem., 241(3), 779–786
- Cortes D. M.** (2001) *Molecular architecture of full-length KcsA: Role of cytoplasmic domains in ion permeation and activation gating*, J. Gen. Physiol., 117(2), 165–180
- Craven R. a, Egerton M., & Stirling C. J.** (1996) *A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors*, EMBO J., 15(11), 2640–2650
- Csordás G., Renken C., Várnai P., Walter L., Weaver D., Buttle K. F., Balla T., Mannella C. A., Hajnóczky G.** (2006) *Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria*, J. Cell Biol., 174(7), 915–921
- Delacour D., & Jacob R.** (2006) *Apical protein transport*, Cell. Mol. Life Sci., 63(21), 2491–2505
- Dong H., Nilsson L., & Kurland C. G.** (1996) *Co-variation of tRNA abundance and codon usage in Escherichia coli at different growth rates*, J. Mol. Biol., 260(5), 649–663

- dos Reis M., Savva R., & Wernisch L.** (2004) *Solving the riddle of codon usage preferences: A test for translational selection*, Nucleic Acids Res., 32(17), 5036–5044
- Doyle D. A.** (1998) *The structure of the potassium channel: Molecular basis of K^+ conduction and selectivity*, Science, 280(5360), 69–77
- Dudek J., Rehling P., & van der Laan M.** (2013) *Mitochondrial protein import: Common principles and physiological networks* Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res., 1833(2), 274–285
- Duret L.** (2000) *tRNA gene number and codon usage in the C. elegans genome are co-adapted for optimal translation of highly expressed genes*, Trends Gen., 16(7), 287–289
- Fåhræus R., Marin M., & Olivares-Illana V.** (2016) *Whisper mutations: Cryptic messages within the genetic code*, Oncogene, 35(29), 3753–3759
- Farewell A., & Neidhardt F. C.** (1998) *Effect of temperature on in vivo protein synthetic capacity in Escherichia coli.*, J. Bacteriol., 180(17), 4704–4710
- Foo B., Williamson B., Young J. C., Lukacs G., & Shrier A.** (2016) *hERG quality control and the long QT syndrome*, J. Physiol., 594(9), 2469–2481
- Fujiki Y., Okumoto K., Mukai S., Honsho M., & Tamura S.** (2014) *Peroxisome biogenesis in mammalian cell*, Front. Physiol., 5 AUG(August), 1–8
- Gazzarrini S., Severino M., Lombardi M., Morandi M., DiFrancesco D., Van Etten J. L., Thiel G., Moroni A.** (2003) *The viral potassium channel Kcv: Structural and functional features* FEBS Lett., 552(1), 12–16
- Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J., Arnstein P., Kersey J. H., Dosik H., Parks W. P.** (1973) *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*, J Natl Cancer Inst, 51(5), 1417–1423
- Gluzman Y.** (1981) *SV-40 transformed simian cells support the replication of SV40 mutants*, Cell, 23(January), 175–182
- Gould S. J., Keller G. a, & Subramani S.** (1987) *Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxyl terminus of firefly luciferase*, J. Cell Biol., 105(6), 2923–2931
- Graham F., Smiley R., Russell W. C., & Nairn R.** (1977) *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*, J. Gen. Virol., 36(2977), 59–74
- Gu W., Zhou T., & Wilke C. O.** (2010) *A universal trend of reduced mRNA stability near the translation-initiation site in prokaryotes and eukaryotes*, PLoS Comput. Biol., 6(2), 1–8
- Hachiya N., Komiya T., Alam R., Iwahashi J., Sakaguchi M., Omura T., Mihara K.** (1994) *MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria*, EMBO J., 13(21), 5146–5154

- Halic M., Becker T., Pool M. R., Spahn C. M. T., Grassucci R. A., Frank J., Beckmann R.** (2004) *Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome*, *Nature*, 427(6977), 808–814
- Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. J.** (1981) *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*, *Pflügers Archiv Eur. J. Physiology*, 391(2), 85–100
- Hanson G., & Collier J.** (2018) *Translation and protein quality control: Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay*, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 19(1), 20–30
- Harley C. A., Jesus C. S. H., Carvalho R., Brito R. M. M., Morais-Cabral J. H.** (2012) *Changes in channel trafficking and protein stability caused by lqt2 mutations in the pas domain of the herg channel*, *PLoS ONE*, 7(3), 1–10
- Heckman K. L., & Pease L. R.** (2007) *Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension*, *Nature Prot.*, 2(4), 924–932
- Hertel B., Tayefeh S., Mehmel M., Kast S. M., Van Etten J., Moroni A., Thiel G.** (2006). *Elongation of outer transmembrane domain alters function of miniature K⁺ channel Kcv*. *J. Membr. Biol.*, 210(1), 21–29
- Hille B.** (2001) *Ion channels of excitable membranes*, 3. Auflage, Sinauer Associates Inc.
- Ho C. K., van Etten J. L., & Shuman S.** (1997) *Characterization of an ATP-dependent DNA ligase encoded by haemophilus influenza*, *J. Virol.*, 71(3), 1369–1374
- Ho C. K., Van Etten J. L., & Shuman S.** (1996) *Expression and characterization of an RNA capping enzyme encoded by Chlorella virus PBCV-1*, *J. Virol.*, 70(10), 6658–64
- Husmann J. A., Patchett S., Johnson A., Sawyer S., Press W. H.** (2015) *Understanding biases in ribosome profiling experiments reveals signatures of translation dynamics in yeast*, *PLoS Genet.*, 11(12), 1–25
- Ikemura T.** (1981) *Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: A proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the E. coli translational system*, *J. Mol. Biol.*, 151(3), 389–409
- Kalies K. U., Görlich D., & Rapoport T. A.** (1994) *Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex*, *J. Cell Biol.*, 126(4), 925–934
- Karniely S., & Pines O.** (2005) *Single translation-dual destination: Mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes*, *EMBO Reports*, 6(5), 420–425
- Kudla G., Murray A. W., Tollervey D., Plotkin J. B.** (2009) *Coding-Sequence determinants of gene expression in Escherichia coli*, *Science*, 324(April), 255–259
- Kupper J.** (1998) *Functional expression of GFP-tagged Kv1. 3 and Kv1.4 channels in HEK 293 cells*, *Eur. J. Neurosci.*, 10(July), 3908–3912

- Lang S., Benedix J., Fedeles S. V., Schorr S., Schirra C., Schäuble N., Jalal C., Greiner M., Haßdenteufel S., Tatzelt J., Kreutzer B., Edelman L., Krause E., Rettig J., Zimmermann R., Dudek J. (2012) *Different effects of Sec61, Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells*, J. Cell Sci., 125(8), 1958–1969
- Lazrak A., Fu L., Bali V., Bartoszewski R., Rab A., Havasi V., Keiles S., Kappes J., Kumar R., Lefkowitz E., Sorscher E. J., Matalon S., Collawn J. F., Bebok Z. (2013) *The silent codon change I507-ATC→ATT contributes to the severity of the ΔF508 CFTR channel dysfunction*, FASEB J., 27(11), 4630–4645
- Leissring M. A., Farris W., Wu X., Christodoulou D. C., Haigis M. C., Guarente L., Selkoe D. J. (2004) *Alternative translation initiation generates a novel isoform of insulin-degrading enzyme targeted to mitochondria*, Biochem. J., 383, 439–446
- Lewohl J. M., Wilson W. R., Mayfield R. D., Brozowski S. J., Morrisett R. A., Harris R. A. (1999) *G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels are target of alcohol action*, Nature Neurosci., 2(12), 1084–1090
- Lithgow T. (2000) *Targeting of proteins to mitochondria*, FEBS Lett., 476(1-2), 22–26
- Lundberg, M., Johansson, C., Chandra, J., Enoksson, M., Jacobsson, G., Ljung, J., Johansson M., Holmgren, A. (2001) *Cloning and expression of a novel human Glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoform*, J. Biol. Chem., 276(28), 26269–26275
- Maiorino M., Scapin M., Ursini F., Biasolo M., Bosello V., Flohé L. (2003) *Distinct promoters determine alternative transcription of gpx-4 into phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase variants*, J. Biol. Chem., 278(36), 34286–34290
- MacKinnon R. (2003) *Potassium channels*, FEBS Lett., 555 (1), 62-65
- Mehmel M. (2004) *Studien zur Funktion von Kaliumkanalproteinen aus Viren eukaryotischer Algen (Phycodnaviridea)*, Dissertation, Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
- Ménétret J. F., Neuhof A., Morgan D. G., Plath K., Radermacher M., Rapoport T. A., Akey C. W. (2000) *The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation*, Mol. Cell, 6(5), 1219–1232
- Meyer D. I., & Dobberstein B. (1980) *A membrane component essential for vectorial translocation of nascent proteins across the endoplasmic reticulum: Requirements for its extraction and reassociation with the membrane*, J. Cell Biol., 87(2), 498–502
- Meyer E., & Fromherz P. (1999) *Ca²⁺ activation of hSlo K⁺ channel is suppressed by N-terminal GFP tag*, Eur. J. Neurosci., 11(July 1998), 1105–1108
- Mikosch M., Hurst A. C., Hertel B., Homann U. (2006) *Diacidic motif is required for efficient transport of the K⁺ channel KAT1 to the plasma membrane*, Plant Physiol., 142(3), 923–930
- Miller C. (2000) *An overview of the potassium channel family*, Genome Biol., 1(4), REVIEWS0004.

- Moriyama E. N., & Powell J. R. (1997) *Codon usage bias and tRNA abundance in Drosophila*, J. Mol. Evol., 45(5), 514-23
- Moroni A., Viscomi C., Sangiorgio V., Pagliuca C., Meckel T., Horvath F., Gazzarrini S., Valbuzzi P., Van Etten J. L., DiFrancesco D., Thiel G. (2002) *The short N-terminus is required for functional expression of the virus-encoded miniature K⁺ channel Kcv*, FEBS Lett., 530(1-3), 65-69
- Munro S., & Pelham H. R. B. (1987) *A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins*, Cell, 48(5), 899-907
- Murakami H., Pain D., & Blobel G. (1988) *70 kD heat shock related protein is one of at least 2 distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria*, J. Cell Biol., 107(6), 2051-2057
- Ng D. T. W., Brown J. D., & Walter P. (1996) *Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane*, J. Cell Biol., 134(2), 269-278
- Nishimura N., & Balch W. E. (1997) *A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum*, Science, 277(5325), 556-558
- Pagliuca C., Goetze T. A., Wagner R., Thiel G., Moroni A., Parcej D. (2007) *Molecular properties of Kcv, a virus encoded K⁺ channel*, Biochem., 46(4), 1079-1090
- Papworth C., Bauer J. C., Braman J., Wright D. A. (1996) *Site-Directed Mutagenesis in One day with >80% Efficiency*, Strategies 9 (3). 3-4
- Peeters N., & Small I. (2001) *Dual targeting to mitochondria and chloroplasts*, Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res., 1541(1), 54-63
- Pelkmans L., & Helenius A. (2003) *Insider information: What viruses tell us about endocytosis*, Current Opinion in Cell Biol., 15(4), 414-422
- Petrova V. Y., Drescher D., Kujumdzieva A. V, & Schmitt M. J. (2004) *Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria*, Biochem. J., 380(Pt 2), 393-400
- Plugge B., Gazzarrini S., Nelson M., Cerana R., Van Etten J. L., Derst C., DiFrancesco D. Moroni A., Thiel G. (2000) *A potassium channel protein encoded by chlorella virus PBCV-1*, Science, 287(5458), 1641-1644
- Potter B. A., Hughey R. P., & Weisz O. A. (2006) *Role of N- and O-glycans in polarized biosynthetic sorting*, Am. J. Physiol.-Cell Physiol., 290(1), C1-C10
- Presnyak V., Alhusaini N., Chen Y. H., Martin S., Morris N., Kline N., Olson S., Weinberg D., Baker K. E., Graveley B. R., Collier J. (2015) *Codon optimality is a major determinant of mRNA stability*, Cell, 160(6), 1111-1124
- Rapoport T. A. (1992) *Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane*, Science, 258(November), 931-936
- Regev-Rudzki N., & Pines O. (2007) *Eclipsed distribution: A phenomenon of dual targeting of protein and its significance*, BioEssays, 29(8), 772-782

- Rizzutto R., Nakase H., Darras B., Francke U., Fabrizi G. M., Mengel T., Walsh F., Kadenbach B., DiMauro S., Schon E. A. (1989) *A gene specifying subunit-viii of human cytochrome-c oxidase is localized to chromosome-11 and is expressed in both muscle and non-muscle tissues*, J. Biol. Chem., 264(18), 10595–10600
- Robin M. A., Anandatheerthavarada H. K., Biswas G., Sepuri N. B. V., Gordon D. M., Pain D., Avadhani N. G. (2002) *Bimodal targeting of microsomal CYP2E1 to mitochondria through activation of an N-terminal chimeric signal by cAMP-mediated phosphorylation*, J. Biol. Chem., 277(43), 40583–40593
- Robin M. A., Prabu S. K., Raza H., Anandatheerthavarada H. K., Avadhani N. G. (2003) *Phosphorylation enhances mitochondrial targeting of GSTA4-4 through increased affinity for binding to cytoplasmic Hsp70*, J. Biol. Chem., 278(21), 18960–18970
- Rodriguez-Boulan E., & Gonzalez A. (1999) *Glycans in post-Golgi apical targeting: Sorting signals or structural props?*, Trends in Cell Biol., 9(8), 291–294
- Roth A. C. (2012) *Decoding properties of tRNA leave a detectable signal in codon usage bias*, Bioinformatics, 28(18), 340–348
- Rudhe C., Clifton R., Whelan J., Glaser E. (2002) *N-terminal domain of the dual-targeted pea glutathione reductase signal peptide controls organellar targeting efficiency*, J. Mol. Biol., 324(4), 577–585
- Sabi R., & Tuller T. (2014) *Modelling the efficiency of codon – tRNA interactions based on codon usage bias*, DNA Res., 21(June), 511–525
- Salari S., Ghasemi M., Fahanik-Babaei J., Saghiri R., Sauve R., Eliassi A. (2015) *Evidence for a KATP channel in rough endoplasmic reticulum (rerKATP Channel) of rat hepatocytes*, PLoS One, 10(5), e0125798
- Scaduto R. C., & Grotyohann L. W. (1999) *Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives*, Biophys. J., 76(1 I), 469–477
- Scherer W. F., Syverton J. T., & Gey G. O. (1953) *Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses*, J. Exp.Med. 97(5), 695-710
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J., White D. J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. (2012) *Fiji: An open-source platform for biological-image analysis*, Nature Methods, 9(7), 676–682
- Schwartz P. J., Stramba-Badiale M., Crotti L., Pedrazzini M., Besana A., Bosi G., Gabbarini F., Goulene K., Insolia R., Mannarino S., Mosca F., Nespoli L., Rimini A., Rosati E., Salice P., Spazzolini C. (2009) *Prevalence of the congenital long-qt syndrome*, Circulation, 120(18), 1761–1767
- Sharp P. M., Tuohy T. M. F., & Mosurski K. R. (1986) *Codon usage in yeast: Cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes*, Nucleic Acids Res., 14(13), 5125–5143
- Silva-Filho M. C. (2003) *One ticket for multiple destinations: Dual targeting of proteins to distinct subcellular locations*, Current Opinion Plant Biol., 6(6), 589–595

- Soto M. A., Gonzalez C., Lissi E., Vergara C., Latorre R.** (2002) *Ca²⁺-activated K⁺ channel inhibition by reactive oxygen species*, Am. J. Physiol, Cell Physiol., 282, 461–471
- Spencer P. S., Siller E., Anderson J. F., & Barral J. M.** (2012) *Silent substitutions predictably alter translation elongation rates and protein folding efficiencies*, J. Mol. Biol., 422(3), 328–335
- Stefanovic S., & Hegde R. S.** (2007) *Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER*, Cell, 128(6), 1147–1159
- Szewczyk A., Jarmuszkiewicz W., & Kunz W. S.** (2009) *Mitochondrial potassium channels*, IUBMB Life, 61(2), 134–143
- Taylor A. B., Smith B. S., Kitada S., Kojima K., Miyaura H., Otwinowski Z., Ito A., Deisenhofer J.** (2001) *Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences*, Structure, 9(7), 615–625
- Thiel G., Baumeister D., Schroeder I., Kast S. M., Van Etten J. L., Moroni A.** (2011) *Minimal art: Or why small viral K⁺ channels are good tools for understanding basic structure and function relations*, Biochim. Biophys. Acta, Biomembr., 1808(2), 580–588
- Tsao D., Shabalina S. A., Gauthier J., Dokholyan N. V., Diatchenko L.** (2011) *Disruptive mRNA folding increases translational efficiency of catechol-O-methyltransferase variant*, Nucleic Acids Res., 39(14), 6201–6212
- Tyson J. R., & Stirling C. J.** (2000) *LHS1 and SIL1 provide a luminal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum*, EMBO J., 19(23), 6440–6452
- Vagin O., Kraut J. A., & Sachs G.** (2008) *Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia* AJP: Renal Physiol., 296(3), F459–F469
- Van Etten J. L.** (2003) *Unusual life style of giant chlorella viruses*, Annu. Rev. of Genet., 37(1), 153–195.
- Van Etten J. L., Graves M. V., Müller D. G., Boland W., Delaroque N.** (2002) *Phycodnaviridae - Large DNA algal viruses*, Arch. Virol., 147(8), 1479–1516
- van Vliet A. R., Verfaillie T., & Agostinis P.** (2014) *New functions of mitochondria associated membranes in cellular signalling*, Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res., 1843(10), 2253–2262
- Vogel J. P., Misra L. M., & Rose M. D.** (1990) *Loss of BiP/ GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast*, J. Cell. Biol., 110(June), 1885–1895
- von Chappuis C.** (2013) *Sorting of membrane proteins: Influence of N-terminal signals using the example of small viral potassium channels*, Dissertation, Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
- von Chappuis C., Meckel T., Moroni A., Thiel G.** (2014) *The sorting of a small potassium channel in mammalian cells can be shifted between mitochondria and plasma membrane*, Cell Calcium, 58(1), 114–121
- von Heijne G.** (1985) *Signal sequences. The limits of variation*, J. Mol. Biol., 184(1), 99–105

- Vongsamphanh R., Fortier P. K., & Ramotar D.** (2001) *Pir1p mediates translocation of the yeast Apr1p endonuclease into the mitochondria to maintain genomic stability*, Mol. Cell. Biol., 21(5), 1647–55
- Walter P., & Blobel G.** (1980) *Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum*, PNAS, 77(12), 7112–6
- Walter P., & Blobel G.** (1981) *Translocation of proteins across the Endoplasmic Reticulum II . Signal Recognition Protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro assembled polysomes synthesizing secretory protein*, J. Cell Biol., 91, 545–550
- Wang W., Zhang X., Gao Q., Lawas M., Yu L., Cheng X., Gu M., Sahoo N., Li X., Li P., Ireland S., Meredith A., Xu H.** (2017) *A voltage-dependent K^+ channel in the lysosome is required for refilling lysosomal Ca^{2+} stores*, J. Cell Biol., 216(6), 1715–1730
- Wilkinson B. M., Regnacq M., & Stirling C. J.** (1997) *Protein translocation across the membrane of the Endoplasmic Reticulum*, J. Membr. Biol., 197, 189–197
- Williamson C. D., Zhang A., & Colberg-Poley A. M.** (2011) *The human cytomegalovirus protein UL37 exon 1 associates with internal lipid rafts*, J. Virol., 85(5), 2100–2111
- Wu Y., & Sha B.** (2006) *Crystal structure of yeast mitochondrial outer membrane translocon member Tom70p*, Nature Struc. & Mol. Biol., 13(7), 589–593
- Young J. C., Hoogenraad N. J., & Hartl F. U.** (2003) *Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70*, Cell, 112, 41–50
- Yu C. H., Dang Y., Zhou Z., Wu C., Zhao F., Sachs M. S., Liu Y.** (2015) *Codon usage influences the local rate of translation elongation to regulate co-translational protein folding*, Mol. Cell, 59(5), 744–754
- Zhang Y., Schäffer T., Wölflle T., Fitzke E., Thiel G., Rospert S.** (2016) *Cotranslational intersection between the SRP and GET targeting pathways to the endoplasmic reticulum of Saccharomyces cerevisiae*, Mol. & Cell. Biol., 36(18), 2374–2383
- Zhou M., Wang T., Fu J., Xiao G., & Liu Y.** (2015) *Nonoptimal codon usage influences protein structure in intrinsically disordered regions*, Mol. Microbiol., 97(5), 974–987

6. Anhang

6.1. DNA- und Aminosäuresequenzen

DNA-Sequenzen:

Kesv

ATGTCCCGGCGACTGTTTGCGACTTGCGGCATCGCTATCGCGCTCAGGGGACTGGTGGTGAGCGGGGGCGTAAAA
GAGATTGTATCGTTTCAGGCCACTGATTGATACTTCGCTCGTCGGCGGAATATTGTCTAATCTGATTTTGCTCGTC
GTTTTCGCTGAACTTTATTGGCAGCTGGACCAAGGGGATGATCACACACACTTCGGCTTCTCGTCCGCGATCGAC
GCTTACTACTTCAGTGCGGTCACGTCTTCCTCTGTCTGGATACGGCGATTTGTTGCCGAAAACCTCCGAAGGCAAAA
TTGCTTACCATCGCACACATTTTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTCCCCGTTGTCTGCGAAGGCTCTCGAGAAG

Kesv_{opt}

ATGAGCAGACGGCTGTTTCGCCACCTGTGGAATCGCCATTGCCCTGCGGGGCCTGGTGGTGTCTGGCGGCCTGAAA
GAAATCGTGTCTTCCGGCCCCCTGATCGACACCAGCCTCGTGGGAGGCATCCTGAGCAACCTGATCCTGCTGGTG
GTGTTTCGCCGAGCTGTACTGGCAGCTGGACCAGGGCGACGACCACACCCACTTCGGCTTCAGCAGCGCCATCGAC
GCCTACTACTTCAGCGCCGTGACCAGCAGCAGCGTGGGCTACGGCGACCTGCTGCCCAAGACCCCCAAGGCCAAG
CTGCTGACAATCGCCACATCCTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTGCCCGTGGTGGCCAAGGCCCTGGAAAAG

Kesv_{deopt}

ATGTCTAGAAGACTTTTTGCTACTTGTGGTATTGCTATTGCTTTGAGAGGTTTGGTTGTTTCTGGTGGTGTAAAG
GAAATAGTTTCTTTTAGACCTTTGATTGATACTTCTTTGGTTGGTGGTATTTTGTCTAACTTGATTTTGTGGTT
GTTTTTGCTGAACATACTGGCAATTGGATCAAGGTGATGATCATACTCATTTTGGTTTTTCTTCTGCTATTGAT
GCTTACTACTTTTCTGCTGTTACTTCTTCTTCTGTTGGTTACGGTGATTTGTTGCCAAAGACTCCAAAGGCTAAG
TTGTTGACTATTGCTCATATTTTGGCTATGTTTTTTGTTATGTTGCCAGTTGTTGCTAAGGCTTTGGAAAAG

Kesv_{random}

ATGTCGCGGCGGCTCTTTGCGACGTGCGGCATTGCTATAGCCTTAAGGGGCCTTGTCGTTTCCGGAGGCGTCAAG
GAGATTGTCTCTTTTAGACCCCTCATTGACACCTCGTTGGTAGGTGGTATACTTTCGAATCTGATTCTGCTAGTC
GTTTTTGCAGAACTGTACTGGCAATTGGACCAGGGAGACGATCACACTCACTTCGGATTTCAGTTCAGCCATAGAT
GCCTACTACTTCTCAGCAGTGACGTCATCTAGTGTAGGTTACGGCGACTTGTTGCCCAAGACCCCGAAAGCAAAA
TTACTGACAATCGCGCACATCTTGGCTATGTTCTTCGTAATGCTTCCGGTTGTAGCGAAGGCTCTTGAAAAG

Kesv₁

ATGAGCAGACGGCTGTTTCGCCACCTGTGGAATCGCCATTGCCCTGCGGGGCCTGGTGGTGTCTGGCGGCGTGAAA
GAAATCGTGTCTTCCGGCCCCCTGATCGACACCAGCCTGGTTCGGAGGCATCCTGAGCAACCTGATCCTGCTGGTG
GTGTTTCGCCGAGCTGTACTGGCAGCTGGACCAGGGCGACGACCACACCCACTTCGGCTTCAGCAGCGCCATCGAC
GCCTACTACTTCAGCGCCGTGACCAGCAGCAGCGTGGGATACGGCGATTTGTTGCCGAAAACCTCCGAAGGCAAAA
TTGCTTACCATCGCACACATTTTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTCCCCGTTGTTCGCGAAGGCTCTCGAGAAG

Kesv₂

ATGTCCCGGCGACTGTTTTCGCACTTTCGGGCATCGCTATCGCGCTCAGGGGACTGGTGGTGAGCGGGGGCGTAAAA
GAGATTGTATCGTTCAGGCCACTGATTGATACTTCGCTCGTCGGCGGAATATTGTCTAATCTGATTTTGCTCGTC
GTTTTTCGCTGAACTTTATTGGCAGCTGGACCAAGGGGATGATCACACACACTTCGGCTTCTCGTCCGCGATCGAC
GCTTACTACTTCAGTGCGGTCACGTCTTCCTCTGTTCGGATACGGCGACCTGCTGCCCAAGACCCCCAAGGCCAAG
CTGCTGACAATCGCCACATCCTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTGCCCGTGGTGGCCAAGGCCCTGGAAAAA

Kesv₃

ATGAGCAGACGGCTGTTTCGCCACCTGTGGAATCGCCATTGCCCTGCGGGGCCTGGTGGTGTCTGGCGGCGTGAAA
GAAATCGTGTCTTCCGGCCCCCTGATCGACACCAGCCTGGTTCGGAGGCATCCTGAGCAACCTGATCCTGCTCGTC
GTTTTTCGCTGAACTTTATTGGCAGCTGGACCAAGGGGATGATCACACACACTTCGGCTTCTCGTCCGCGATCGAC
GCTTACTACTTCAGTGCGGTCACGTCTTCCTCTGTTCGGATACGGCGACCTGCTGCCCAAGACCCCCAAGGCCAAG
CTGCTGACAATCGCCACATCCTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTGCCCGTGGTGGCCAAGGCCCTGGAAAAA

Kesv₄

ATGAGCAGACGGCTGTTTCGCCACCTGTGGAATCGCCATTGCCCTGCGGGGCCTGGTGGTGTCTGGCGGCGTGAAA
GAAATCGTGTCTTCCGGCCCCCTGATCGACACCAGCCTGGTTCGGAGGCATCCTGAGCAACCTGATCCTGCTGGTG
GTGTTTCGCCGAGCTGTACTGGCAGCTGGACCAGGGCGACGACCACACCCACTTCGGCTTCAGCAGCGCCATCGAC
GCCTACTACTTCAGCGCCGTGACCAGCAGCAGCGTGGGATACGGCGATTTGTTGCCGAAAACCTCCGAAGGCAAAA
TTGCTTACCATCGCACACATTTTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTGCCCGTGGTGGCCAAGGCCCTGGAAAAA

Kesv₅

ATGAGCAGACGGCTGTTTCGCCACCTGTGGAATCGCCATTGCCCTGCGGGGCCTGGTGGTGTCTGGCGGCGTGAAA
GAAATCGTGTCTTCCGGCCCCCTGATCGACACCAGCCTCGTGGGAGGCATCCTGAGCAACCTGATCCTGCTGGTG
GTGTTTCGCCGAGCTGTACTGGCAGCTGGACCAGGGCGACGACCACACCCACTTCGGCTTCAGCAGCGCCATCGAC
GCCTACTACTTCAGCGCCGTGACCAGCAGCAGCGTGGGCTACGGCGACCTGCTGCCCAAGACCCCCAAGGCCAAG
CTGCTGACAATCGCCACATCCTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTCCCCGTTGTTCGCGAAGGCTCTCGAGAAG

Kesv₆

ATGTCCCGGCGACTGTTTGCGACTTGCGGCATCGCTATCGCGCTCAGGGGACTGGTGGTGAGCGGGGGCGTAAAA
 GAGATTGTATCGTTTCAGGCCACTGATTGATACTTCGCTCGTCGGCGGAATATTGTCTAATCTGATTTTGCTCGTC
 GTTTTCGCTGAACTTTATTGGCAGCTGGACCAAGGGGATGATCACACACACTTCGGCTTCTCGTCCGCGATCGAC
 GCTTACTACTTCAGTGCGGTCACGTCTTCCTCTGTTCGGATACGGCGATTTGTTGCCGAAAACCTCCGAAGGCAAAA
 TTGCTTACCATCGCACACATTTTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTGCCCCTGGTGGCCAAGGCCCTGGAAAAG

Kesv_{30/50opt}

ATGTCCCGGCGACTGTTTGCGACTTGCGGCATCGCTATCGCGCTCAGGGGACTGGTGGTGAGCGGGGGCGTAAAA
 GAGATTGTATCGTTCCGGCCCCCTGATCGACACCAGCCTCGTGGGAGGCATCCTGAGCAACCTGATCCTGCTGGTG
 GTTTTCGCTGAACTTTATTGGCAGCTGGACCAAGGGGATGATCACACACACTTCGGCTTCTCGTCCGCGATCGAC
 GCTTACTACTTCAGTGCGGTCACGTCTTCCTCTGTTCGGATACGGCGATTTGTTGCCGAAAACCTCCGAAGGCAAAA
 TTGCTTACCATCGCACACATTTTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTCCCCGTTGTCGCGAAGGCTCTCGAGAAG

Kesvopt_{3050wt}

ATGAGCAGACGGCTGTTTCGCCACCTGTGGAATCGCCATTGCCCTGCGGGGCCTGGTGGTGTCTGGCGGCGTGAAA
 GAAATCGTGTCCTTCAGGCCACTGATTGATACTTCGCTCGTCGGCGGAATATTGTCTAATCTGATTTTGCTCGTC
 GTGTTTCGCCGAGCTGTACTGGCAGCTGGACCAGGGCGACGACCACACCCACTTCGGCTTCAGCAGCGCCATCGAC
 GCCTACTACTTCAGCGCCGTGACCAGCAGCAGCGTGGGCTACGGCGACCTGCTGCCCCAAGACCCCCAAGGCCAAG
 CTGCTGACAATCGCCCACATCCTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTGCCCCTGGTGGCCAAGGCCCTGGAAAAG

Kcv

ATGTTAGTGTTTAGTAAATTTCTAACGCGAACTGAACCATTTCATGATACATCTCTTTATTCTCGCAATGTTTCGTG
 ATGATCTATAAATTCTTCCCGGGAGGGTTCGAAAATAACTTCTCTGTTGCAAACCCGGACAAAAAGGCATCATGG
 ATAGATTGTATATACTTCGGAGTAACGACACACTCTACTGTTCGGATTCGGAGATATACTGCCAAAGACGACCGGC
 GCAAAGCTTTGTACGATAGCACATATAGTAACAGTGTTCTTCATCGTTCTAACTTTA

Kcv_{opt}

ATGCTGGTGTCTCTAAAGTTCTTGACTAGAACTGAACCATTTCATGATCCACTTGTTTCATTTTGGCCATGTTTCGTC
 ATGATCTACAAGTTTTTTCCAGGTGGTTTCGAGAACAACTTCTCTGTTGCTAATCCAGATAAGAAGGCTTCTTGG
 ATTGATTGCATCTACTTCGGTGTTACTACTCATTCTACTGTTGGTTTCGGTGATATTTTGCCAAAACTACTGGT
 GCTAAGTTGTGCACTATTGCTCATATCGTTACCGTTTTTCTTCATCGTCTTGACCTTG

Chim3.3

ATGTCCCGGCGACTGTTTGCGACTTGCGGCATCGCTATCGCGCTCAGGGGACTGGTGGTGAGCGGGGGCGTAAAA
GAGATTGTATCGTTTCAGGCCACTGATTGATACTTCGCTCGTCGGCGGAATATTGTCTAATCTGATTTTGCTCATG
ATCTATAAATTCTTCCCGGGAGGGTTCGAAAATAACTTCTCTGTTGCAAACCCGGACAAAAAGGCATCATGGATA
GATTGTATATACTTCGGAGTAACGACACACTCTACTGTCGGATTTCGGAGATTTGTTGCCGAAAACCTCCGAAGGCA
AAATTGCTTACCATCGCACACATTTTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTCCCCGTTGTGCGGAAGGCTCTCGAGAAG

Chim3.3_{opt}

ATGAGCAGACGGCTGTTTCGCCACCTGTGGAATCGCCATTGCCCTGCGGGGCCTGGTGGTGTCTGGCGGCGTGAAA
GAAATCGTGTCTTCCGGCCCCCTGATCGACACCAGCCTCGTGGGAGGCATCCTGAGCAACCTGATCCTGCTGATG
ATCTACAAGTTCTTCCCAGGCGGCTTCGAGAACAACCTTCAGCGTGGCCAACCCCGACAAGAAGGCCAGCTGGATC
GACTGCATCTACTTCGGCGTGACCACCCACAGCACCGTGGGCTTCGGCGACCTGCTGCCCCAAGACCCCCAAGGCC
AAGCTGCTGACAATCGCCCACATCCTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTGCCCGTGGTGGCCAAGGCCCTGGAAAAG

Chim3.3_{26/68opt}

ATGTCCCGGCGACTGTTTGCGACTTGCGGCATCGCTATCGCGCTCAGGGGACTGGTGGTGAGCGGGGGCGTAAAA
GAGATTGTATCGTTTCAGGCCACTGATTGATACTTCGCTCGTCGGCGGAATATTGTCTAATCTGATTTTGCTCATG
ATCTACAAGTTCTTCCCAGGCGGCTTCGAGAACAACCTTCAGCGTGGCCAACCCCGACAAGAAGGCCAGCTGGATC
GACTGCATCTACTTCGGCGTGACCACCCACAGCACCGTGGGCTTCGGCGACTTGTGTTGCCGAAAACCTCCGAAGGCA
AAATTGCTTACCATCGCACACATTTTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTCCCCGTTGTGCGGAAGGCTCTCGAGAAG

Chim3.3_{opt26/68wt}

ATGAGCAGACGGCTGTTTCGCCACCTGTGGAATCGCCATTGCCCTGCGGGGCCTGGTGGTGTCTGGCGGCGTGAAA
GAAATCGTGTCTTCCGGCCCCCTGATCGACACCAGCCTCGTGGGAGGCATCCTGAGCAACCTGATCCTGCTGATG
ATCTATAAATTCTTCCCGGGAGGGTTCGAAAATAACTTCTCTGTTGCAAACCCGGACAAAAAGGCATCATGGATA
GATTGTATATACTTCGGAGTAACGACACACTCTACTGTCGGATTTCGGAGATCTGCTGCCCCAAGACCCCCAAGGCC
AAGCTGCTGACAATCGCCCACATCCTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTGCCCGTGGTGGCCAAGGCCCTGGAAAAG

Chim3.4_{opt}

ATGAGCAGACGGCTGTTTCGCCACCTGTGGAATCGCCATTGCCCTGCGGGGCCTGGTGGTGTCTGGCGGCGTGAAA
GAAATCGTGTCTTCCGGCCCCCTGATCGACACCAGCCTCGTGGGAGGCATCCTGAGCAACCTGATCCTGCTGgtg
ATCTACAAGTTCTTCCCAGGCGGCTTCGAGAACAACCTTCAGCGTGGCCAACCCCGACAAGAAGGCCAGCTGGATC
GACTGCATCTACTTCGGCGTGACCACCCACAGCACCGTGGGCTTCGGCGACCTGCTGCCCCAAGACCCCCAAGGCC
AAGCTGCTGACAATCGCCCACATCCTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTGCCCGTGGTGGCCAAGGCCCTGGAAAAG

Chim4.0_{opt}

ATGAGCAGACGGCTGTTTCGCCACCTGTGGAATCGCCATTGCCCTGCGGGGCCTGGTGGTGTCTGGCGGCGTGAAA
GAAATCGTGTCTTCCGGCCCCCTGATCGACACCAGCCTCGTGGGAGGCATCCTGAGCAACCTGATCCTGCTGgtg
gtgTACAAGTTCTTCCCAGGCGGCTTCGAGAACAACCTTCAGCGTGGCCAACCCCGACAAGAAGGCCAGCTGGATC
GACTGCATCTACTTCGGCGTGACCACCCACAGCACCGTGGGCTTCGGCGACCTGCTGCCCAAGACCCCAAGGCC
AAGCTGCTGACAATCGCCCACATCCTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTGCCCGTGGTGGCCAAGGCCCTGGAAAAG

Aminosäuresequenzen:**Kesv**

MSRRLFATCGIAIALRGLVVGKVKEIVSFRPLIDTSLVGGILSNLILLVVF AELYWQLDQGDH THFGFSSAID
A Y Y F S A V T S S S V G Y G D L L P K T P K A K L L T I A H I L A M F F V M L P V V A K A L E K

Kcv

M L V F S K F L T R T E P F M I H L F I L A M F V M I Y K F F P G G F E N N F S V A N P D K K A S W I D C I Y F G V T T H S T V G F G D I L P K T T G
A K L C T I A H I V T V F F I V L T L

6.2. Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

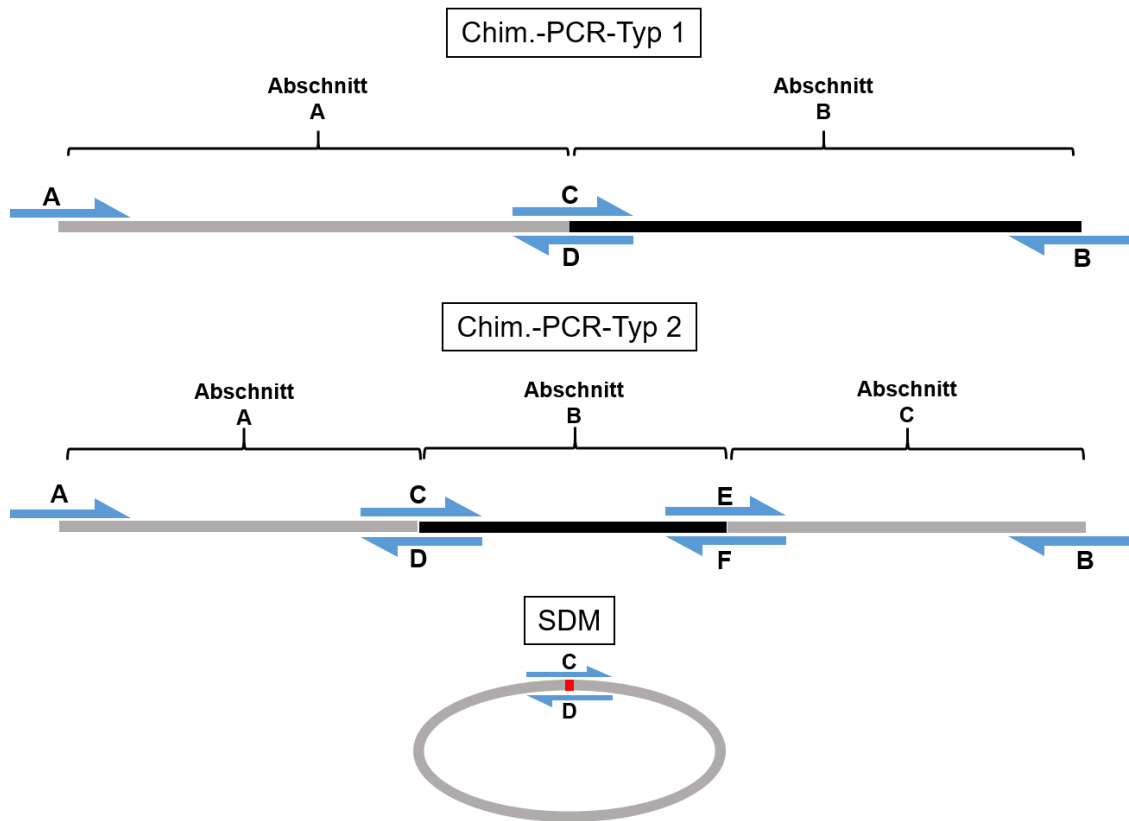


Abbildung 6.2.1: Schema der angewendeten PCR-Typen zur Erstellung der unterschiedlichen Chimären

Primernamen und Zweck	Oligonukleotidsequenz 5' – 3'	PCR-Typ
Primer zur Erstellung von Kesv ₁		Chim.-PCR 1
(A) fw Nhe1 KesvWt	<u>GCTAGCATGTCCCGGCGA</u>	
(B) rev KesvOpt EcoRI	<u>GAATTCTTTTCCAGGGCCTT</u>	
(C) KesvWt KesvOpt fw	TCTGTGCGATACGGCGATCTGCTGCCCAAGACCCCC	
(D) KesvWt KesvOpt rev	GGGGGTCTTGGGCAGCAGATCGCCGTATCCGACAGA	
Primer zur Erstellung von Kesv ₂		Chim.-PCR 1
(A) fw Nhe1 KesvOpt	<u>GCTAGCATGAGCAGACGG</u>	
(B) rev KesvWt EcoRI	ccg <u>GAATTCTTCTCGAGAGC</u>	
(C) KesvOpt KesvWt fw	AGCGTGGGCTACGGCGACTTGTGCGAAAACTCCG	
(D) KesvOpt KesvWt rev	CGGAGTTTTTCGGCAACAAGTCGCCGTAGCCCACGCT	

Primer zur Erstellung von Kev ₃		Chim.-PCR 1
(A) fw Nhe1 KevOpt	<u>GCTAGCATGAGCAGACGG</u>	
(B) rev KevOpt EcoRI	<u>GAATTC</u> TTTTTCCAGGGCCTT	
(C) Kev1 Kev2 fw	TTCAGCGAAAACGACGAGCAGGATCAGGTTGCTCAG	
(D) Kev1 Kev2 rev	CTGAGCAACCTGATCCTGCTCGTCGTTTTTCGCTGAA	
Primer zur Erstellung von Kev ₄		Chim.-PCR 1
(A) fw Nhe1 KevOpt	<u>GCTAGCATGAGCAGACGG</u>	
(B) rev KevOpt EcoRI	<u>GAATTC</u> TTTTTCCAGGGCCTT	
(C) Kev2 Kev1 fw	ATCGCACACATTTTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTG	
(D) Kev2 Kev1 rev	CAGCATCACGAAGAACATGGCCAAAATGTGTGCGAT	
Primer zur Erstellung von Kev ₅		Chim.-PCR 1
(A) fw HindIII KevOpt	ccc <u>AAGCTT</u> ATGAGCAGACGG	
(B) rev KevWt EcoRI	ccg <u>GAATTC</u> CTTCTCGAGAGC	
(C) fw KevOpt KevWt	ATCGCCACATCCTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTC	
(D) rev KevOpt KevWt	GAGCATCACGAAGAACATGGCCAGGATGTGGGCGAT	
Primer zur Erstellung von Kev ₆		Chim.-PCR 1
(A) fw HindIII KevWt	ccc <u>AAGCTT</u> ATGTCCCGGCGA	
(B) rev KevOpt BamHI	cggt <u>GGATCCC</u> CTTTTCCAGGG	
(C) fw KevWt KevOpt	ACCATCGCACACATTTTGGCCATGTTCTTCGTGATGCTG	
(D) rev KevWt KevOpt	CAGCATCACGAAGAACATGGCCAAAATGTGTGCGATGGT	
Primer zur Erstellung von Kev _{30/50opt}		Chim.-PCR 2
(C) fw KevWt KevOpt 30	GTAAAAGAGATTGTATCGTTCCGGCCCCCTGATCGACACC	
(D) rev KevWt KevOpt 30	GGTGTGATCAGGGGGCCGAACGATACAATCTCTTTTAC	
(E) fw KevOpt KevWt 50	AGCAACCTGATCCTGCTGGTGGTTTTTCGCTGAACTTTATTGG	
(F) rev KevOpt KevWt 50	CCAATAAAGTTTCAGCGAAAACCACCAGCAGGATCAGGTTGCT	
Primer zur Erstellung von Kev _{opt30/50wt}		Chim.-PCR 2
(C) fw KevWt KevOpt 30	TGAAAGAAATCGTGTCTTCAGGCCACTGATTGATAC	
(D) rev KevWt KevOpt 30	GTATCAATCAGTGGCCTGAAGGACACGATTTCTTTCA	
(E) fw KevOpt KevWt 50	CTAATCTGATTTTGCTCGTCGTGTTGCGCCGAGCTGTACTG	
(F) rev KevOpt KevWt 50	CAGTACAGCTCGGCGAACACGACGAGCAAAATCAGATTAG	
Primer zur Erstellung von Chim3.3 _{opt}		Chim.-PCR 2
(A) fw HindIII KevOpt	gctc <u>AAGCTT</u> ATGAGCAGACGG	
(B) rev BamHI KevOpt	cggt <u>GGATCCC</u> CTTTTCCAGGG	
(C) fw 3.3 KevOptKevOpt	AGCAACCTGATCCTGCTGATGATCTACAAGTTCTTC	
(D) rev 3.3 KevOptKevOpt	GAAGAACTTGTAGATCATCAGCAGGATCAGGTTGCT	
(E) fw KevOpt KevOpt	ACCGTGGGCTTCGGCGACCTGCTGCCAAGACCCCC	
(F) rev KevOpt KevOpt	GGGGGTCTTGGGCAGCAGGTCGCCGAAGCCCACGGT	

Primer zur Erstellung von Chim3.4 _{opt}		SDM
(C) fw 3.4 KesvOpt KcvOpt	AACCTGATCCTGCTGgtgATCTACAAGTTCTTCCCA	
(D) rev 3.4 KesvOptKcvOpt	TGGGAAGAAGCTTGTAGATcacCAGCAGGATCAGGTT	
Primer zur Erstellung von Chim4.0 _{opt}		SDM
(C) fw 4 KesvOpt KcvOpt	CTGATCCTGCTGgtggtgTACAAGTTCTTCCCAGGC	
(D) rev 4 KesvOpt KcvOpt	GCCTGGGAAGAAGCTTGTAcaccacCAGCAGGATCAG	
Primer zur Erstellung von Chim _{26-68opt}		Chim.-PCR 2
(A) fw HindIII KesvWt	cccAAGCTTATGTCCCGGCGA	
(B) rev BamHI KesvWt	cgcGGATCCCTTCTCGAGAGC	
(C) fw KesvWt KcvOpt	TCTAATCTGATTTTGCTCATGATCTACAAGTTCTTC	
(D) rev KesvWt KcvOpt	GAAGAACTTGTAGATCATGAGCAAAATCAGATTAGA	
(E) fw KcvOpt KesvWt	ACCGTGGGCTTCGGCGACTTGTTGCCGAAAACCTCCG	
(F) rev KcvOpt KesvWt	CGGAGTTTTTCGGCAACAAGTCGCCGAAGCCCACGGT	
Primer zur Erstellung von Chimopt _{26-68wt}		Chim.-PCR 2
(A) fw HindIII KesvOpt	gctcAAGCTTATGAGCAGACGG	
(B) rev BamHI KesvOpt	cggTGGATCCCTTTTCCAGGG	
(C) fw 3.3 KesvOpt KcvWT	AGCAACCTGATCCTGCTGATGATCTATAAATTCTTC	
(D) rev 3.3 KesvOpt KcvWT	GAAGAATTTATAGATCATCAGCAGGATCAGGTTGCT	
(E) fw 3.3 KcvWt KesvOpt	ACTGTCGGATTTCGGAGATCTGCTGCCCAAGACCCCC	
(F) rev 3.3 KcvWt KesvOpt	GGGGGTCTTGGGCAGCAGATCTCCGAATCCGACAGT	

6.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1: Schema zur cotranslationalen Proteinsortierung in das ER	3
Abbildung 1.1.2: Schema der posttranslationalen Proteinsortierung in die Mitochondrien	5
Abbildung 1.4.1: Kaliumkanal-Hauptklassen und bekannte Beispielkanäle	15
Abbildung 1.4.2: Alignment der Aminosäuresequenz von Kcsv und Kcv _{PBCV1}	16
Abbildung 3.1.1: Kategorien der Sortierung	32
Abbildung 3.1.2: Lokalisation von Kcsv::eGFP	33
Abbildung 3.1.3: Prozentuale Verteilung von Kcsv auf die Zellkompartimente	34
Abbildung 3.1.4: Prozentuale Verteilung von Kcsv auf die Zellkompartimente an drei verschiedenen Betrachtungstagen.....	35
Abbildung 3.2.1: Lokalisation von Kcsv _{opt} ::eGFP	37
Abbildung 3.2.2: Lokalisationsstudie von Kcsv _{opt} ::eGFP mittels Markerproteinen	38
Abbildung 3.2.3: Beispielhaftes Schema zur Berechnung des Intensitätsverhältnisses zwischen mitochondrialer und cytosolischer Fluoreszenzintensität.....	39
Abbildung 3.2.4: Prozentuale Sortierungsverteilung von Kcsv _{opt} im Vergleich zu Kcsv	40
Abbildung 3.2.5: Expressionseffizienz von Kcsv bzw. Kcsv _{opt} zu verschiedenen Zeitpunkten.....	42
Abbildung 3.2.6: Transfektionseffizienz von Kcsv::eGFP bzw. Kcsv _{opt} ::eGFP zu verschiedenen Zeitpunkten	43
Abbildung 3.2.7: FACS Messung von Kcsv::eGFP bzw. Kcsv _{opt} ::eGFP exprimierender HEK293-Zellen mittels TMRM	44
Abbildung 3.2.8: FACS Messung von Kcsv bzw. Kcsv _{opt} exprimierender HEK293-Zellen, ohne eGFP-tag, mittels TMRM	45
Abbildung 3.2.9: Prozentuale Sortierungsverteilung von Kcsv bzw. Kcsv _{opt} bei 37 und 25 °C Wachstumstemperatur.....	47
Abbildung 3.2.10: Lokalisation von Kcsv::eGFP in HaCaT- und HeLa-Zellen.....	49
Abbildung 3.2.11: Lokalisation von Kcsv::eGFP in A549- und COS-7-Zellen	50
Abbildung 3.2.12: Lokalisation von Kcsv _{opt} ::eGFP in HaCaT-, HeLa-, A549- und COS-7-Zellen: ...	51
Abbildung 3.2.13: Prozentuale Sortierungsverteilung von Kcsv bzw. Kcsv _{opt} in verschiedenen Zelltypen.....	52
Abbildung 3.2.14: Lokalisation von Kcsv _{deopt}	54
Abbildung 3.2.15: Lokalisationsstudie von Kcsv _{deopt} ::eGFP mittels Markerproteinen	55
Abbildung 3.2.16: Prozentuale Sortierungsverteilung von Kcsv _{deopt} im Vergleich zu Kcsv und Kcsv _{opt}	56
Abbildung 3.2.17: Exemplarischer Banden-Verlauf bei Expression von Kcsv, Kcsv _{opt} und Kcsv _{deopt} im Vergleich zu freiem eGFP	58

Abbildung 3.2.18: Verlauf der <i>codon usage</i> entlang der Gen-Sequenz von Kesv, Kesv _{opt} , Kesv _{deopt} und Kesv _{random}	59
Abbildung 3.2.19: Lokalisation von Kesv _{random} ::eGFP.....	61
Abbildung 3.2.20: Prozentuale Sortierungsverteilung von Kesv _{random} im Vergleich zu Kesv, Kesv _{opt} und Kesv _{deopt}	62
Abbildung 3.3.1: Schema zur Zusammensetzung der Kesv-Kesv _{opt} -Chimären	64
Abbildung 3.3.2: Verlauf der <i>codon usage</i> entlang der Gen-Sequenz von Kesv ₁ und Kesv ₂ , Kesv ₃ und Kesv ₄ , Kesv ₅ und Kesv ₆ im paarweisen Vergleich	65
Abbildung 3.3.3: Lokalisationsstudie der Kategorie „Mito+ER“ mittels des mitochondrialen Markerproteins COXVIII::mCherry	67
Abbildung 3.3.4: Lokalisationsstudie der Kategorie „Mito+ER“ mittels des ER-ständigen Markerproteins KDEL::mCherry	68
Abbildung 3.3.5 auf der folgenden Seite: Lokalisation von Kesv ₁ ::eGFP	70
Abbildung 3.3.6: Lokalisation von Kesv ₂ ::eGFP.....	72
Abbildung 3.3.7: Lokalisation von Kesv ₃ ::eGFP.....	73
Abbildung 3.3.8 auf der folgenden Seite: Lokalisation von Kesv ₄ ::eGFP	74
Abbildung 3.3.9 auf der folgenden Seite: Lokalisation von Kesv ₅ ::eGFP und Kesv ₆ ::eGFP	77
Abbildung 3.3.10: Prozentuale Sortierungsverteilung der Kesv-Kesv _{opt} -Chimären im Vergleich zu Kesv und Kesv _{opt}	79
Abbildung 3.3.11: Verteilungsverhältnis der als ER- und mitochondrial-sortiert kategorisierten Zellen der Kesv-Kesv _{opt} -Chimären	80
Abbildung 3.3.12: Vergleich der Prozentualen Sortierungsverteilung von Kesv ₁ in vier Quadranten des Coverslips.....	82
Abbildung 3.3.13: Vergleich der Prozentualen Sortierungsverteilung von Kesv ₁ unter Konditionen variierender Glukoseverfügbarkeit	84
Abbildung 3.3.14: HEK293-Zellen zeigen eine homogene Verteilung der Zellzyklusphasen	86
Abbildung 3.3.15: Die Behandlung von HEK293-Zellen mit 7 μ M RO-3306 führt zu einem klaren Arrest in der G2-Phase.....	87
Abbildung 3.3.16: Vergleich der Prozentualen Sortierungsverteilung von Kesv ₁ ::eGFP mit und ohne RO-3306-Behandlung	88
Abbildung 3.3.17: Beobachtung der Zellteilung einer Kesv ₄ ::eGFP exprimierenden HEK293-Zelle	90
Abbildung 3.3.19: Schema zur Zusammensetzung der 30/50-Kesv-Kesv _{opt} -Chimären:	92
Abbildung 3.3.20: Verlauf der <i>codon usage</i> entlang der Gen-Sequenz von Kesv, Kesv _{opt} , Kesv _{30-50opt} und Kesv _{opt30/50wt}	93

Abbildung 3.3.21 auf der folgenden Seite: Lokalisation von Kesv _{30/50opt} ::eGFP	94
Abbildung 3.3.22: Lokalisation von Kesv _{opt30/50wt} ::eGFP	96
Abbildung 3.3.23: Prozentuale Sortierungsverteilung der 30/50-Kesv-Kesv _{opt} -Chimären im Vergleich zu Kesv und Kesv _{opt}	97
Abbildung 3.4.1: Lokalisation von Kcv::eGFP	101
Abbildung 3.4.2: Prozentuale Verteilung von Kcv auf die Zellkompartimente	102
Abbildung 3.5.1: Lokalisation von Kcv _{opt} ::eGFP	103
Abbildung 3.5.2: Prozentuale Sortierungsverteilung von Kcv _{opt} im Vergleich zu Kcv	104
Abbildung 3.6.1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Kcv-Kesv-Chimären 1 - 6	105
Abbildung 3.6.2: Aminosäuresequenz-Design der ersten TMD der Chimären Chim3 - Chim4	106
Abbildung 3.6.3: Lokalisation von Chim3.3::eGFP und Chim3.3 _{opt} ::eGFP	108
Abbildung 3.6.4: Lokalisation von Chim3.4::eGFP und Chim3.4 _{opt} ::eGFP	109
Abbildung 3.6.5: Lokalisation von Chim4::eGFP und Chim4 _{opt} ::eGFP	110
Abbildung 3.6.6: Prozentuale Sortierungsverteilung der Chimären Chim3.3 _{opt} - Chim4 _{opt} im Vergleich zu ihrem jeweiligen Wildtyp	111
Abbildung 3.6.7: Designschema der neuen Chim3.3-Chimären: Chim3.3 _{26-68opt} und Chim3.3 _{opt26-68wt}	113
Abbildung 3.6.8: Verlauf der <i>codon usage</i> entlang der Gen-Sequenz von Chim3.3, Chim3.3 _{opt} , Chim3.3 _{26-68opt} und Chim3.3 _{opt26-68wt}	113
Abbildung 3.6.9: Lokalisation von Chim3.3 _{26-68opt}	115
Abbildung 3.6.10 auf der folgenden Seite: Lokalisation von Chim3.3 _{opt26-68wt}	115
Abbildung 3.6.11: Prozentuale Sortierungsverteilung der Chimären Chim3.3 _{26-68opt} und Chim3.3 _{opt26-68wt} im Vergleich zu Chim3.3 und Chim3.3 _{opt}	117
Abbildung 3.6.12: Prozentuale Sortierungsverteilung von Chim3.3 _{opt} bzw. Chim3.3 _{opt26-68wt} bei 33 °C, 34 °C, 35 °C, 37 °C und 39 °C Wachstumstemperatur	120
Abbildung 6.2.1: Schema der angewendeten PCR-Typen zur Erstellung der unterschiedlichen Chimären	140

6.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Medienzusammensetzung	19
Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	20
Tabelle 3: Anteilige Lokalisation in Prozent der Sortierungspopulationen in jedem Quadranten	81

6.5. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Apn1	Apurinic/aprimidinic endonuclease 1
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BiP	Immunglobulin- <i>heavy chain</i> -Bindepotein
CAI	<i>Codon adapation index</i>
CCCP	Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorphenylhydrazon
Chim	Chimäre
CHO-K1 Zellen	<i>chinese hamster ovary cells</i>
CLSM	<i>confocale laser scanning microscopy</i>
COXVIII	VIII. Untereinheit Cytochrom C Oxidase
CYP	Cytochrome P450 Familie
ddH ₂ O	doppeltdeionisiertes Wasser
deopt	deoptimiert
DLAC	N-decylamine lactobionamide
DMEM	Dulbecco 's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Ribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EsV-1	<i>Ectocarpus siliculosus</i> Virus 1
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
fw	forward
GC-Gehalt	Guanin/Cytosin-Gehalt
Get	<i>guided entry of tail anchored protein insertion</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HCMV	humanes Cytomegalovirus
HEK293 Zellen	<i>Human embryonic kidney 293 Zellen</i>
Hsp 70/90	<i>heat shock protein</i>

IMM	<i>inner mitochondrial membrane</i>
IMS	<i>inter<u>m</u>embrane <u>s</u>pace</i>
kb	Kilonbasen
Kcv	Kaliumkanal aus dem Chlorella Virus
Kcv NTS	Kaliumkanal Chlorella Virus <i>next to smith</i>
kDA	Kilodalton
Kesv	Kaliumkanal aus dem <i>Ectocarpus siliculosus</i> Virus
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MAMs	<i><u>m</u>itochondrial <u>a</u>ssociated <u>m</u>embranes</i>
Mdm 10	<i><u>m</u>itochondrial <u>d</u>ynamics and <u>m</u>orphology 10</i>
Mito	Mitochondrien
MMP	Mitochondriales Membranpotential
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
MSF	<i><u>m</u>itochondrial import <u>s</u>timulation factor</i>
MTS	<i><u>m</u>itochondrial <u>t</u>argeting <u>s</u>equences</i>
N	Versuchsanzahl
n	Probenzahl
NEAA	<i>non-essential amino acids</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
OMM	<i>outer mitochondrial membrane</i>
opt	optimiert
ORF	<i>open reading frame</i>
OST	Oligosaccharid Transferase
PBCV-1	<i>Paramecium bursaria</i> Chlorella Virus 1
PBS	<i>Phosphate buffered saline solution</i>
PCC	<i>Pearson Correlations Coefficient</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PHGPx	Phospholipid-Hydroxyperoxid-Glutathion-Peroxidase
PI	Propidium Iodid
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTS-1	peroxisomal-ähnliches <i>targeting</i> -Signal
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	reverse

ROI	<i>region of interest</i>
Rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SAM	<i><u>s</u>orting and <u>a</u>ssembly <u>m</u>achinery</i>
SDM	<i>site-directed mutagenesis</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SOC-Medium	<i>Super optimal Broth-Medium</i>
SPC	<i><u>s</u>ignal-<u>p</u>eptidase-<u>c</u>omplex</i>
SR	<i><u>S</u>ignal recognition particle <u>r</u>eceptor</i>
SRP	<i><u>S</u>ignal <u>r</u>ecognition <u>p</u>article</i>
TA-Proteine	<i><u>t</u>ail-<u>a</u>ncored-Proteine</i>
TIM	<i><u>T</u>ranslokator of the <u>i</u>nnner <u>m</u>itochondrial membrane</i>
TM	Transmembrandomäne
TMD	Transmembrandomäne
TMRM	Tetramethylrhodamin-methylester
TOM	<i><u>T</u>ranslokator of the <u>o</u>uter <u>m</u>embrane</i>
TRC	<i><u>t</u>ransmembrane <u>r</u>ecognition <u>c</u>omplex</i>
Tris	Tri(hydroxymethyl)methylamin
tRNA	<i>transfer</i> Ribonukleinsäure
US	unsortiert
VSV-G	<i><u>v</u>esicular <u>s</u>tomatitis <u>v</u>irus-<u>G</u>lykoprotein</i>
Wt	Wildtyp

6.6. Eigene Arbeit

Alle Versuche, die Datenanalyse und das Schreiben der hier vorgelegten Arbeit wurden ausschließlich von mir selbst durchgeführt mit der Ausnahme von:

Die Erstellung der Kcv-Kesv-Chimären Chim3.3_{opt}, Chim3.4_{opt} und Chim4.0_{opt} mittels Chimären-PCR und *side directed mutagenesis* (SDM) PCR und deren konfokal mikroskopische Primärbetrachtung (**Abschnitt 3.6.2**) wurden von Matea Cartolano (Bachelor Studentin) unter meiner Aufsicht durchgeführt.

6.7. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 23.10.2018

.....
Marina Elisa Kithil, M.Sc.

6.8. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Marina Elisa Kithil
Geburtsdatum	16. Juni 1990 in München
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Bildung

09/2015 bis heute	Promotion Fachbereich Biologie, AG Thiel <i>Plant Membrane Biophysics</i> , Technische Universität Darmstadt
08/2015	Master of Science in Technischer Biologie Technische Universität Darmstadt Titel der Master-Thesis: «Duale Sortierung von Membranproteinen: Der Einfluss von äußeren Faktoren auf die Sortierung von viralen Kaliumkanälen als Modellsystem»
04/2013 bis 08/2015	Masterstudium Technische Biologie Technische Universität Darmstadt
01/2013 bis 03/2013	Praktikum im Dipartimento di Bioscienze von Prof. Dr. Moroni Università degli Studi di Milano in Mailand, Italien
12/2012	Bachelor of Science in Biologie Technische Universität Darmstadt Titel der Bachelor-Thesis: «Die elektrophysiologische Charakterisierung der hERG-Mutante R883K»
09/2009 bis 12/2012	Bachelorstudium Biologie Technische Universität Darmstadt
06/2009	Abitur Markgraf-Ludwig-Gymnasium, Baden-Baden

6.9. Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich in den letzten drei Jahren begleitet, und maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Gerhard Thiel, für die Bereitstellung dieses spannenden Themas, das mich über die gesamte Zeit gefesselt hat, die hilfreichen Anregungen und freundliche Unterstützung bei allen Fragestellungen.

Herrn Prof. Dr. Adam Bertl, für die Übernahme des Koreferats.

Frau Dr. Brigitte Hertel und **Frau PD Dr. Indra Schröder**, für all die Hilfe, Gespräche und Geduld auch nach vielen, vielen Fragen.

Dr. Markus Langhans, für die geduldige Hilfe bei allen Klonierungsangelegenheiten und deinen unermüdlichen Einsatz das CLSM für uns am Laufen zu halten.

Barbara Reinhardt und **Tanja Musielak**, für die große Hilfsbereitschaft in allen organisatorischen Fragen.

Silvia Haase, für viele schöne und interessante Westernblots und alle meine sehr speziellen Bestellungen. **Mirja Manthey**, für alle schönen Zellen dieser Arbeit. **Silvia Lenz**, für viele, viele Agar-Platten und **Brigitte Hehl**, für alle sauberen Glaswaren und sterilen Pipettenspitzen.

Ihr ermöglicht erst einen organisierten und funktionierenden Laboralltag.

Der gesamten **AG Thiel**, **AG Meckel** und **AG Stein**, für eine entspannte aber produktive Arbeitsatmosphäre, das Freitags-Frühstück, meine erste und viele weitere Feuerzangenbowlen, Kegeln, Kickern, Fußballspielen, größere und kleinere Mittagessen und einfach einer schönen gemeinsamen Zeit.

Dem gesamten **Kinderzimmer** dafür, dass man Fragen einfach in den Raum werfen konnte und Antwort erhielt sowie viele interessante Diskussionen.

Frau Dr. Fenja Siotto, für die in dieser AG entstandene Freundschaft.

Tobias Winterstein, für deine genialen Design Skills und den ein oder anderen gemeinsamen Workshop.

Anja Engel, für eine wilde Zeit im Dschungel der Proteinsortierungswege und New Orleans. Der Austausch mit dir hat oft genug meine Hoffnung auf ein „gutes Ergebnis“ am Leben erhalten.

Denise Eckert, für unsere gemeinsame Zeit, die gegenseitige Hilfe, Unterstützung und Respekt, die ich in den letzten vier Jahren und auch in Zukunft nicht missen wollte. Für all die Spaziergänge, lustigen Aktionen, Gespräche und einfach einer wichtigen Freundschaft – Danke!

Den tapferen und geduldigen Korrekturlesern: **Barbara, Marco** und meinem **Papa**, die massiv zur Lesbarkeit dieser Arbeit beigetragen haben. **Frau Dr. Brigitte Hertel**, der ich für Ihre wichtigen inhaltlichen Anmerkungen und das „Erbsenzählen“ besonders danke.

Meinen lieben **Freundinnen** aus dem TU-Chor, die mich auch an schlechten Tagen zum Lachen bringen. Allen voran **Marie** und **Aileen** – ohne Euch wäre Darmstadt nur halb so schön.

Meinen Eltern **Alessandra** und **Volker Kithil** und meinem Bruder **Marco**, für Eure Liebe, Unterstützung und Euer Vertrauen in mich. Danke, dass Ihr es mir ermöglicht habt meinen Weg zu gehen, stets in der Gewissheit einen sicheren Hafen zu haben.

Meinem Freund **Thomas Schatz**, für all die richtigen Worte, deine Geduld und Ruhe.